

COMPOSICIONES VACUNALES PARA EL CONTROL DE LA AMIBIASIS BASADAS  
EN LA PROTEÍNA DE SUPERFICIE DE 112 kDa de *Entamoeba histolytica*

AP20 Recv 07/PTO 11 MAY 2006

Sector Técnico

La presente invención se relaciona con el campo de la inmunología, específicamente con el desarrollo de métodos de control de la infección por *Entamoeba histolytica*, basados en vacunas.

Técnica Anterior

*Entamoeba histolytica*, protozooario de amplia distribución mundial, es responsable de la amibiasis humana. Se calcula que 10 % de la población del planeta es portadora, aunque menos del 1 % llega a desarrollar la enfermedad (Walsh, J.A. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. En: J. Ravdin, ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba Histolytica*. Nueva York: Wiley Medical, 1988; 93-105).

Un estimado realizado en 1984 indicaba la presencia de 500 millones de personas infectadas y, de ellas, 40 millones enfermas con colitis invasiva o abscesos extraintestinales. El número de muertes por esta causa fue, en ese año, de 40 000 (Walsh, J.A. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. En: J. Ravdin, ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba. Histolytica*. Nueva York: Wiley Medical, 1988; 93-105). En un boletín emitido por la OMS 9 años después, se informaba que este microorganismo causaba anualmente más de 100 mil muertes, ocupando el segundo lugar en la lista de mortalidad por protozoarios, precedido por el agente causal de la malaria (WHO. Amoebiasis. *WHO Weekly Epidemiology Record* 1997; 72: 97-100.). Esto evidencia, por una parte, el creciente y grave problema de salud que representa la amibiasis para la humanidad y por otra, lo insuficientes que han resultado las medidas para su control.

La distribución geográfica de esta parasitosis no es exclusiva de las regiones tropicales; ha sido encontrada en todos los climas, incluyendo las regiones subpolares (Salata, R.A., Ravdin, J.I. Inmunoprofilaxis. En: J. Ravdin, ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba Histolytica*. Nueva York: Wiley Medical, 1988; 785-801). Sin embargo, debido a la transmisión fecal-oral de la amiba, las zonas de mayor incidencia en el planeta se corresponden con las de menor desarrollo socioeconómico. La ausencia de medidas sanitarias, la miseria y la ignorancia explican el comportamiento endémico que presenta esta enfermedad. (Caballero Salcedo A., Viveros Rogel M, Salvatierra B, Tapia Conyer R, Sepúlveda Amor J, Gutierrez G y Ortiz Ortiz L. Seroepidemiology of Amebiasis in México. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 412-419). Por ejemplo en México la amibiasis representa un grave problema de salud pública nacional. El 8.4% de la población resultó seropositiva a antígenos de *Entamoeba histolytica*, en un estudio realizado en 1994. (Caballero Salcedo A., Viveros Rogel M, Salvatierra B, Tapia Conyer R, Sepúlveda Amor J, Gutierrez G y Ortiz Ortiz L. Seroepidemiology of Amebiasis in México. *Am*

BEST AVAILABLE COPY

J Trop Med Hyg 1994; 50: 412-419). Para Cuba esta enfermedad no constituye un grave problema de salud se puede citar un estudio realizado en una Escuela Primaria de Ciudad de la Habana en el que se analizaron 425 niños de los cuales solo 5 (1.1%) manifestaron infección con *Entamoeba histolytica* (Arencibia A. Y colaboradores. Parásitos intestinales en niños que asisten a una Escuela Primaria Urbana de Ciudad de la Habana. Boletín Epidemiológico Semanal del IPK. 2001; vol. 11 No. 8.). En el año 2000 se reportó un acumulado en todo el país de 8 casos de disentería amibiana aguda lo que representó una tasa de 0.68 por cada 100 000 habitantes (Tablas: Enfermedades de Declaración Obligatorias (EDO) Seleccionadas (Boletín Epidemiológico Semanal del IPK. 2001; vol. 11 No. 8.).

El mecanismo patogénico de la amiba es un proceso complejo y multifactorial aun no comprendido en su totalidad. A pesar de esto, existe consenso entre los estudiosos del tema en que al menos 3 eventos son imprescindibles para la colonización del epitelio intestinal: (Petri WA, Ravdin JI. In vitro models of amebic pathogenesis. En: J. Ravdin, ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica*. Nueva York: Wiley Medical, 1988; 191-204).

1. La adhesión de los trofozoítos a la célula blanco.
2. El efecto citopático dependiente de contacto.
3. La fagocitosis.

La adhesión es un factor importante de virulencia para los microorganismos patógenos que les permite establecerse, reproducirse y colonizar los tejidos del huésped (Ravdin JI. Pathogenesis of Amebiasis: An overview. En: J. Ravdin, ed. Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica*. Nueva York: Wiley Medical, 1988; 166-176).

Las moléculas del patógeno especializadas en establecer estos contactos específicos con las células del hospedero se conocen con el nombre de adhesinas y algunas han sido caracterizadas. Entre ellas se encuentran:

La lectina de 260 kDa. Esta lectina media la adherencia a mucinas del colon humano y a células epiteliales (Ravdin JI, John JE, Johnston LI, Innes DJ, Guerrant RL. Adherence of trophozoites to rat and human colonic mucosa. Infect Immun 1985; 48: 292-297). En la actualidad se cuenta con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la amiba y capaces de bloquear la adhesión que reconocen a la lectina purificada (Petri WA Jr, Smith RD, Schlesinger PH, Murphy CF, Ravdin JI. Isolation of the galactose binding lectin of *Entamoeba histolytica* J.Clin. Invest 1987; 80: 1238-1244). La lectina de 220 kDa es una proteína de membrana capaz de adherirse a células MDCK (línea celular aislada de riñón de perro (*Madin Darby canine kidney cell*)) y de hemaglutinar eritrocitos humanos.

La adhesina de 112 kDa fue identificada mediante el uso de mutantes deficientes en adhesión y de anticuerpos monoclonales. Estos anticuerpos inhiben la adherencia de los trofozoítos a eritrocitos y células epiteliales. Esta proteína está afectada en mutantes deficientes en adhesión (Arroyo R, Orozco E. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. Mol Biochem Parasitol 1987; 23: 151-158). Recientemente se ha podido comprobar que es un heterodímero compuesto por un polipéptido de 78 kDa con función de adhesina y otro de 49 kDa con actividad de cisteín proteasa (García Rivera G, Rodríguez MA, Ocadiz R, Martínez-López C, Arroyo R, González Robles A, Orozco E. *Entamoeba histolytica*: a novel cystein protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. Molecular Microbiology 1999; 33: 556-568). También se conoce que anticuerpos monoclonales dirigidos contra la Lectina de 150 kDa, glicoproteína de superficie, son capaces de inhibir la adherencia de amibas a eritrocitos y a células CHO, así como la eritrofagocitosis y la citotoxicidad en células CHO: (Cheng XJ, Tusukamoto H, Kaneda Y, Tachibana H. Identification of the 150 kDa surface antigen of *Entamoeba histolytica* as a galactose and N- acetyl-D galactosamine-inhitable lectin. Parasitol Res 1997; 84:632-639).

*E. histolytica* es una de las células citotóxicas más potentes conocidas. Debe su nombre precisamente, a la increíble capacidad que tiene para destruir tejidos humanos. Ocasiona disrupción de las barrera intestinal secretando enzimas proteolíticas y lisando células epiteliales e inflamatorias del huésped (Ravdin JI. *Entamoeba histolytica*: from Adherence to Enteropathy. J. Infect. Dis 1989; 159: 420-429).

La mucosa intestinal es la barrera más importante contra microorganismos entéricos y los anticuerpos IgA secretores juegan un papel central en la exclusión de los patógenos de la superficie epitelial. Inmunoglobulinas de tipo A contra *E. histolytica* se han detectado en la secreción biliar, la leche materna, el calostro, la saliva y los fluidos intestinales (Ortiz Ortiz L, Mora N, Zambrano Villa SG, Carrero JC, Sánchez Zerpa M, Osuna A, Rosales Borges DM. Secretory immune response in patient with intestinal amoebiasis. *Parasite immunol* 1998; 20: 503-507). No obstante, su papel en la protección inmune contra la infección amibiana aún se investiga.

Los esfuerzos hasta ahora acometidos no han dado frutos en la práctica debido a que *E. histolytica* tiene la capacidad de evadir la inmovilización por anticuerpos (Calderón J, Muñoz ML, Acosta HM. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in *Entamoeba*. *J Exp Med* 1980; 151: 184-193), la lisis mediada por la vía clásica del complemento, se desconocen importantes aspectos en la respuesta inmune protectora, como es el papel de las células del sistema inmune en dicha respuesta (Ravi VV, Mithal S, Malavinya AN, Tandon BN.

Immunologic studies in amebic liver abscess. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74: 300), ha influido también la plasticidad del ADN de la amiba en la expresión de genes y factores del hospedero no bien estudiados.

Por otra parte, estudios en modelos animales y en la clínica han aportado evidencias del papel

5 central que representan los mecanismos de inmunidad mediada por células en la defensa del huésped contra la amiba. (Salata RA, Martínez Palomo A, Murphy CF, Canales L, Segovia E, Trevino N. Murray HW, Ravdin JI. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* 1986b;

136 :2633-2639; Schain DC, Salata RA, Ravdin JI.. Development of amebicidal cell mediated immunity in gerbils (*Meriones unguiculatus*) immunized with the the galactosa inhitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol* 1995; 81: 563- 568; Ghost PK,

Castellanos Barba C, Ortiz Ortiz L. Intestinal amebiasis: cyclic suppression of the immune response. *Parasitol Res* 1995; 81: 205-210 ; Alba-Hurtado F, Díaz Otero F, Valdivia G, Reyes R, Tsutsumi V, Acosta G. Cellular immune response of intracecal inoculated Mongolian gerbils

15 with *Entamoeba histolytica*: trophozoites. *Rev latinoam Microbiol* 1999; 41: 205-210). Existen evidencias que demuestran que linfocitos T de pacientes curados de abscesos hepáticos amibianos presentan respuesta proliferativa específica a antígenos de *E. histolytica* y producción de linfocinas (IL-2 e INF $\gamma$ ) (Salata RA, Pearson RP, Murphy CF, Ravdin JI. Interaction of human leukocytes with *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amebae by the activated

20 macrophage: *J.Clin. Invest* 1985a; 76:491) y que al menos *in vitro*, inducen una actividad amebicida en los macrófagos derivados de monocitos (Salata RA, Martínez Palomo A, Murphy CF, Canales L, Segovia E, Trevino N. Murray HW, Ravdin JI. Patients treated for amebic liver abscess develop cell-mediated immune responses effective *in vitro* against *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* 1986b; 136 :2633-2639, Schain DC, Salata RA, Ravdin JI.. Human T

25 lymphocyte proliferation, lymphokine production, and amebicidal activity elicited by the galactosa inhitable adherence protein of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1992; 60:2143-2146) .

Sin embargo no se han podido determinar los mecanismos por los que macrófagos activados y linfocitos T estimulados resisten frente al poder citolítico de las amibas.

30 Es importante señalar que una activación de la respuesta inapropiada puede exacerbar la enfermedad (Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1,Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146). La producción de IL-4, IL-10 y TGF $\beta$  (respuesta Th2) puede inhibir la respuesta inmune a *E. histolytica* (Lin JY, Chadee K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trofozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J.*

*Immunol* 1992; 148: 3999-4005). La PGE2 producida en fase temprana de la infección por amibas (Wang W, Chadee K.. *Entamoeba histolytica* alters arachidonic acid metabolism in macrophages in vitro and in vivo. *Immunology* 1992; 76: 242-250), estimula la transcripción de IL-4 y deprime la de IL-2, lo que pudiera explicar la inmunosupresión transitoria que se observa en esta fase. (Lacour M, Arrighi JF, Muller KM, Carlberg C, Sauret JH, Hauser C. cAMP up-regulates IL-4 and IL-5 production from activated CD4+ T cell while decreasing IL-2 release and NF-AT induction. *Int. Immunol* 1994; 6:1333-1343).

Teniendo en cuenta que el humano es el único hospedero relevante para *E. histolytica*, se ha sugerido que un programa de vacunación efectivo podría erradicar la amebiasis (Stanley SL. Progress toward and amebiasis vaccine. *Parasitology Today*. 1996; 12: 7-14). Es por ello que las proteínas del parásito con un papel crucial en la patogenia de la enfermedad, especialmente las involucradas en adhesión (Kobiler D, Mirelman D. Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trofozoites. *Infect. Immun* 1980; 29: 221-225; Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun* 1994a; 62: 1166-1170; Dodson MJ, Lenkowski PJ Jr, Eubanks AC, Jackson TFGH, NapodanoJ, Leyerly DM, Lockhart LA, Mann BJ, Petri WA. Infection and Immunity mediated by the carbohidrant recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal-GalNac lectin. *J Infect Dis* 1999; 179: 460-466), han despertado un interés adicional para su uso como candidatos vacunales.

Una de las moléculas de superficie mejor caracterizadas para este fin es el heterodímero de la lectina específica de galactosa y N-acetil D galactosamina (260 kDa). La subunidad de 170 kDa ha resultado la de mayor interés desde el punto de vista inmunológico, habiéndose reportado protección en modelos animales después de la administración de la proteína natural, recombinante, péptidos derivados de la misma y vacunas de ADN por distintas vías (Lotter H, Khajawa F; Stanley SL Jr; Tannich E.. Protection of gerbils from amebic liver abscess by vaccination with a 25-mer peptide derived from the cysteine-rich region of *Entamoeba histolytica* galactose-specific adherence lectin. *Infect. Immun* 2000, 68:4416-4421), (Kelsall BL, Ravdin, J.I. Immunization of rats with 260-kilodalton *Entamoeba histolytica* galactose inhibitable lectin elicits an intestinal secretory immunoglobulin A response that has in vitro adherence inhibitory activity. *Infect Immun* 1995; 63: 686-689), (Dodson MJ, Lenkowski PJ Jr, Eubanks AC, Jackson TFGH, NapodanoJ, Leyerly DM, Lockhart LA, Mann BJ, Petri WA. Infection and Immunity mediated by the carbohidrant recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal-GalNac lectin. *J Infect Dis* 1999; 179: 460-466), (Lotter H, Zhang T, Seydel KB, Stanley SL Jr; Tannich E.. Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170 kDa lectin conferring

antibody-mediated protection against invasive amebiasis. *J Exp Med* 1997; 185: 1793-1803), (Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun* 1994a; 62: 1166-1170), (Mann BJ, col Neutralizing monoclonal antibody epitopes of *Entamoeba histolytica* galactose adhesin map to the cysteine rich extracellular domain of the 170 kDa subunit. *Infect Immun* 1993; 61: 1772-1778), (Zhang T, col. Use of a recombinant 170 kDa surface Ag of *Entamoeba histolytica* for serodiagnosis of amebiasis and identification of immunodominant domain of the native molecule *J. Clin. Microbiol* 1992; 30: 2788-2792), (Schain DC, Salata RA, Ravdin JL. Development of amebicidal cell mediated immunity in gerbils (*Meriones unguiculatus*) immunized with the the galactose inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Parasitol* 1995; 81: 563- 568), Petri WA, Ravdin JL. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica* *Infect Immun* 1991; 59: 97-101), (Schain DC, Salata RA, Ravdin JL. Human T lymphocyte proliferation, lymphokine production, and amebicidal activity elicited by the galactose inhibitable adherence protein of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1992; 60:2143-2146), (Gaucher y Chadee 2000).

Otra de las proteínas de membrana más estudiadas es la proteína rica en serina de *E. histolytica* (SREHP) después de la inmunización de animales de experimentación con esta proteína, péptidos constituyentes de la misma, en forma de vacuna de ADN y expresada en vectores vivos atenuados como *S. typhi* y *V. cholerae*, se ha demostrado una protección variable. (Zhang T, Stanley SL. Oral immunization with and attenuated vaccine strain of *Salmonella typhimurium* expressing the serine rich *Entamoeba histolytica* protein induces an antiamebic immune response and protect gerbils from amebic liver abscess. *Infect Immun* 1996; 64 :1526.-1531), (Ryan ET, Butterton JR, Zhang T, Baker MA, Stanley SL, y Calderwood, SB. Oral immunization with attenuated vaccine strain of *Vibrio cholerae* expressing a dodecapeptide repeat of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein fused to the cholera toxin B subunit induces systemic and mucosal antiamebic and anti-*V. cholerae* antibodies responses in mice. *Infect Immune* 1997; 65: 3118-3125), (Zhang T, Li E, Stanley SL. Oral immunization with the dodecapeptide repeat of the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) fused to the cholera toxin B subunit induces a mucosal and systemic anti-SREHP antibody response. *Infect Immun* 1995; 63: 1349-1355), (Zhang T, Cieslak PR, Foster L, Kunz Jenkins C, Stanley SL. Antibodies to the serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevent amebic liver abscess in severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Parasite Immunol* 1994c;16: 225-230). (Zhang T, Cieslak PR, Stanley SL. Protection of gerbils from amebic liver abscess by

immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. *Infect Immun* 1994a; 62: 1166-1170), (Zhang T, Stanley SL.. DNA vaccination with de serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevents amebic liver abscess in rodent models of disease. *Vaccine*. 2000; 18: 868-874).

- 5 La lectina de 220 kDa es una proteína de membrana que es reconocida, en más del 60% de los casos estudiados, por el suero de pacientes con absceso hepático amibiano (Meza, 1989). Con el interés de conocer su inmunogenicidad, ratones BALB/c se inmunizaron subcutáneamente con la proteína nativa, una recombinante y péptidos de esta última obtenidos por tratamientos con urea-N chlorosuccinamido. En los animales inmunizados se demostró un
- 10 estado de protección frente al reto intrahepático (Martínez Gómez P, Pérez Carrillo VL, Talamás Rohana P. Preliminary study of 220 kDa Lectin elicit immune response in hamster: possible vaccine candidate *Arch Med Res* 1997; 28: S267-S268), (Talamás Rohana P, Schilie Guzmán MA, Hernández Ramírez VI, Rosales Encina JL. T-cell suppression and selective *in vivo* activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220 kDa lectin. *Infect Immune*
- 15 1995 ; 63: 3953)

Otra proteína interesante como blanco en el diseño de vacunas es una rica en cisteína de 29/30 kDa. La secuencia codificante de esta proteína se determinó en (Torian BE, Flores BM, Stoeher VL, Hagen FS, Stamm WE. CDNA sequence analysis of a 29 kDa cysteine-rich surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 6335-6362).

- 20 Subsecuentemente, este antígeno fue identificado en la cepa HM1-IMSS (Tachinaba H, Ihrara S, Kobayashi S, Kaneda Y, Takechi T, Watanabe T. Differences in genomic DNA sequences between pathogenic and nonpathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* identified by polimerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2234-2239) y su caracterización molecular mostró que posee un inusual dominio de 18 aminoácidos rico en cisteína (Bruchhaus I,
- 25 TannichE. Analysis of the genomic sequence encoding the 29 kDa cysteine rich protein of *Entamoeba histolytica*. *Trop Med Parasitol* 1993; 44: 116-118). Se ha demostrado que dicha proteína es inmunogénica, pues más del 80% del suero de pacientes con absceso hepático amibiano la reconocieron (Flores B M, Reed SL, Ravdin JI, Torian B.E. Serological reactivities to purified recombinant and native 29 kDa peripheral membrane protein of pathogenic
- 30 *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1403-1407). Después de inmunizar animales con esta proteína se demostró un 70 % de protección en un modelo de absceso intrahepático (Soong CJG, Torian BE, Abd Alla MD, Jackson TFHG, Gatharim V, Ravdin JI. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with recombinant *Entamoeba histolytica* 29 kilodalton antigen. *Infect Immun* 1995; 63: 472-477).

Sin embargo todas las vacunas experimentales anteriores se basan en la inmunización con solo un antígeno constituyente del parásito (adhesinas), lo cual limita su efectividad, ya que la amiba es un parásito complejo con gran cantidad de adhesinas y otras proteínas asociadas con su patogenicidad y virulencia, por lo que preparados vacunales basados en solo un componente serán insuficientes para controlar la infección y sus consecuencias, debiéndose por lo tanto desarrollar vacunas que contengan más de un determinante de virulencia con el objetivo de inhibir simultáneamente varios de los mecanismos de agresión del parásito. Por otro lado, el uso de vacunas basadas en un componente podría favorecer la selección de mutantes que posteriormente serían refractarias a los mecanismos inmunes inducidos por la vacunación.

Recientemente se ha reportado la presencia de la proteína amibiana de 112 kDa, la cual es una molécula de superficie que comparte funciones de adhesina y de proteasa (García Rivera G, Rodríguez MA, Ocadiz R, Martínez-López C, Arroyo R, González Robles A, Orozco E. *Entamoeba histolytica*: a novel cystein protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology* 1999; 33: 556-568). La molécula corresponde a un heterodímero, compuesto por un polipéptido de 78 kDa con función de adhesina y otro de 49 kDa con actividad de cisteín proteasa y que cada uno está codificado por un gen independiente. Estos genes se localizaron en el genoma de forma adyacente, separados tan sólo por una secuencia no codificante de 188 pb. (García Rivera G, Rodríguez MA, Ocadiz R, Martínez-López C, Arroyo R, González Robles A, Orozco E. *Entamoeba histolytica*: a novel cystein protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology* 1999; 33: 556-568). Hasta el momento esta proteína no ha sido empleada en el desarrollo de formulaciones con uso específico para la terapéutica, la profilaxis o el diagnóstico, de enfermedades asociadas a *Entamoeba histolytica*.

#### Divulgación de la Invención

El objeto de la presente invención es el desarrollo de composiciones vacunales basadas en el uso de la proteína de superficie de 112 KD de *Entamoeba histolytica* con fines profilácticos y terapéuticos en relación con la infección producida por este protozoario, ya sea en formulaciones que incluyen los genes que integran la misma y administrada como vacuna de ADN o formulaciones con la proteína purificada o fragmentos de la misma.

Sorprendentemente se ha observado que la inmunización con formulaciones que contienen la mezcla de las proteínas o con formulaciones que contienen la mezcla de los genes (vacunas de ADN), producen una mayor reducción del daño hepático producido en el modelo de reto intraportal en hamsters, al ser comparado con el producido por cada proteína o cada gen por separado y este efecto es significativamente superior al esperado para la mezcla, lo que indica un

efecto potenciador o sinérgico en la protección contra el daño hepático al inmunizar con la mezcla (Ejemplo 10).

Este efecto sinérgico de dos proteínas amibianas no ha sido reportado con anterioridad, por lo que constituye una nueva estrategia para lograr nuevas formulaciones vacunales efectivas contra la amebiasis.

Las preparaciones vacunales de la invención están constituidas por la proteína natural purificada, así como por sus 2 subunidades (cistein proteasa y adhesina) obtenidas por vía recombinante en *E. Coli*, utilizadas solas o mezcladas. Estas composiciones utilizan entre 30  $\mu$ g y 1 mg de proteína, constituyendo este principio activo entre el 25% y el 70% de la formulación total. Para el caso particular de las mezclas, las subunidades de la proteína se emplearon en proporciones iguales utilizándose dosis que incluyen 10 y 1000  $\mu$ g y que constituyen entre 10-80 % de la composición total en dependencia de la formulación empleada.

También forma parte de la presente invención formulaciones vacunales que contienen los genes codificantes de las subunidades con actividad de cistein proteasa y adhesina en un vector de expresión apropiado, empleándolos solos en dosis comprendidas entre 5 $\mu$ g y 800  $\mu$ g o preferiblemente combinados en proporción 1:1 en la misma composición, con dosis que incluyen entre 10  $\mu$ g y 800  $\mu$ g de ADN y que constituyen entre el 25-80% de la formulación total.

Se incluye en esta invención la administración de los productos de los genes codificantes de las subunidades con actividad de cistein proteasa y adhesina, expresados en vectores vivos atenuados a seleccionar del grupo de *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella sp*, *Vaccinia*, Adenovirus, Poliovirus en los cuales se introducen los genes mediante transformación genética empleando vectores plasmídicos apropiados y que son administrados en un rango de dosis comprendido entre 20  $\mu$ g y 100  $\mu$ g del vector vivo atenuado con excipientes adecuados, constituyendo este principio activo entre el 25% y el 60% de la formulación total.

Las composiciones que forman parte de la presente invención pueden ser utilizadas en forma profiláctica y terapéutica en la infección humana con *Entamoeba histolytica*.

Con todas las composiciones utilizadas se demostró la inducción de una respuesta inmune específica humoral (Ejemplos del 2 al 6) y celular (Ejemplos del 7 al 9) en los hamsters inmunizados, así como la inhibición por parte del suero de los animales inmunizados de la adhesión y efecto citopático de los trofozoitos a líneas celulares en cultivo (Ejemplo 11).

También se incluye en la presente invención el uso de cualquiera de las composiciones vacunales por cualquiera de las vías seleccionadas del grupo de: vía ocular, ótica, vaginal, rectal, endovenosa, subcutánea, y tópica en piel. Particularmente la vía oral, intranasal, intradérmica e intramuscular.

La presente invención aborda de forma novedosa el desarrollo de vacunas para la prevención y tratamiento de la amibiasis a partir del empleo de formulaciones basadas en una proteína o los genes que la codifica, logrando estimular una respuesta inmune efectiva no solo contra el efecto citopático provocado por este microorganismo (alcanzado por anteriores candidatos vacunales) sino también contra la colonización intestinal del mismo, elemento hasta el momento no resuelto y de importancia cardinal tanto para la prevención de las manifestaciones clínicas extraintestinales o complicaciones de la amibiasis como para el tratamiento terapéutico efectivo.

La presente invención será descrita a través de los siguientes ejemplos específicos.

## 10 Ejemplos de Realización

### Ejemplo 1. Obtención de los plásmidos *pcdna-Ehadh112* y *pcdna-Ehcp112*

Para la construcción de ambos plásmidos se empleó el vector de expresión *pcDNA<sub>3</sub>* (Invitrogen, San Diego, USA), el cual se cortó con las enzimas de restricción del sitio múltiple de clonaje, BamH I, EcoR I para la clonación del gen de la cisteín proteasa (1.3 Kb), mientras que digerido con Xba I, Apa I (Gibco, EUA) se utilizó para la clonación de un fragmento del gen de la adhesina amibiana (1.7 Kb). Los insertos génicos correspondientes se obtuvieron por restricción enzimática a partir del trabajo previo realizado por García-Ribera y col. en el cual obtuvieron un fragmento de 5.6 kb que contenía dos marcos de lectura abiertos que forman la proteína amibiana de superficie de 112 kDa (García-Rivera G, Avila A, Ayala P, Arrollo R, Rigother MC y Orozco C. 1997. Identification and localization of the cell binding domain in the 112 kDa adhesin gene of *Entamoeba histolytica*. Arch. Med. Res 28s:164-165). La purificación de los insertos se realizó por adsorción a perlas de vidrio utilizando el kit GeneClean II (BIO 101, USA) y fueron ligados a los vectores correspondientes. Los plásmidos obtenidos se denominaron *pcDNA-Ehcp112* y *pcDNA-Ehadh112* respectivamente. Estas construcciones fueron introducidas en *Escherichia coli* cepa DH-5 $\alpha$  a partir de donde fueron purificadas mediante el uso de columnas del Kit comercial Quiagen Giga-Plasmid columns (Quiagen, EUA), y siguiendo las indicaciones del manual de purificación del fabricante. La pureza y concentración del ADN obtenido se determinó por análisis espectrofotométrico en un equipo DU 650 (Beckman, USA) leyendo la absorbancia de la muestra a 260/280 nm. El ADN también se visualizó en geles de agarosa al 0.8 % según el método de Sambrook y colaboradores (Sambrook K, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2ª. Edición. Cold Spring Harbor Lab. Press. EUA. El DNA separado se visualizó por irradiación con luz ultravioleta de 310 nm y se registró en el equipo GelDoc 1000 (BioRad, EUA). El inserto lo constituyó un fragmento de 1.7 Kb del gen de la adhesina, de los 2.0 Kb totales que la componen, que careció de los

primeros 360 pares de bases del extremo 5' del gen, pero que incluyó desde las posibles regiones transmembranales hasta el final de su extremo 3'. El vector en este caso aportó el codón de inicio de la traducción. Dicha construcción se utilizó para transformar bacterias de *E. coli* *DH5α* competentes. El plásmido recombinante se extrajo de las bacterias mediante una purificación por lisis alcalina y se comprobó su identidad al digerirlo con las enzimas utilizadas en la estrategia de clonación. Esta digestión permitió liberar el gen de la adhesina de 1.7 Kb de peso molecular, del vector de 5.4 Kb (figura 1) y así seleccionar los cultivos bacterianos que tenían la construcción de interés. Para corroborar la identidad de la construcción *pcDNA-Ehadh112*, una muestra se secuenció empleando un oligonucleótido que permitió leer la secuencia desde el extremo de clonación 5' y 200 pb más, cadena abajo (resultados no mostrados). El segundo plásmido vacunal se construyó con el gen de la subunidad menor de la proteína de superficie amibiana de 112 kDa, el de la proteasa. Al plásmido resultante se le denominó *pcDNA-Ehcp112*. Dicha construcción se utilizó para transformar bacterias de *E. coli* *DH5α* competentes. El plásmido recombinante se extrajo de las bacterias mediante una purificación por lisis alcalina y se comprobó su identidad por análisis de restricción con las enzimas utilizadas en la clonación. Esta digestión permitió liberar el gen de la cisteín proteasa de 1.3 Kb de peso molecular, del vector de 5.4 Kb (figura 2) en los casos en los que se encontró la construcción de interés. Con el objetivo de corroborar la identidad del plásmido *pcDNA-Ehcp112*, una muestra del ADN se sometió a análisis en un equipo de secuenciación automática, de forma similar a como se hizo para el plásmido anterior (resultado no mostrado).

**Ejemplo 2.** Transfección de células L929 y expresión *in vitro* de los polipéptidos Ehadh112 y Ehcp112.

Se emplearon las construcciones plasmídicas descritas en el ejemplo 1.

Los ensayos de transfección se realizaron según los protocolos de la Guía de transfección de Gibco, BRL. Las células se crecieron en placas de 35 mm (COSTAR, EUA) hasta lograr una confluencia celular entre el 60 y el 80 %. Por cada placa se utilizaron 2 µg del ADN plasmídico a transfectar, diluído en 100 µl de medio (DMEM, EUA) libre de suero bovino fetal (Gibco, BRL, EUA) y 25 µl de lipofectamina (Gibco, BRL, EUA) diluída en 100 µl de medio libre de suero. Las placas se incubaron 6 horas a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. A las 24 horas del comienzo de la transfección se reemplazó el medio de las placas por medio fresco completo (DMEM, con suero fetal al 10 %, 100 µg/ml de ampicilina y 100 µg/ml de estreptomycin) y 48 horas después se le adicionó al cultivo celular 1µg/ml de medio DMEM, del antibiótico de selección, geneticina (Gibco, BRL, EUA). Para los ensayos de RT-PCR se emplearon cultivos de células crecidas en placas de 100 mm hasta un 80-90 % de confluencia, a partir de

primeros 360 pares de bases del extremo 5' del gen, pero que incluyó desde las posibles regiones transmembranales hasta el final de su extremo 3'. El vector en este caso aportó el codón de inicio de la traducción. Dicha construcción se utilizó para transformar bacterias de *E. coli DH5α* competentes. El plásmido recombinante se extrajo de las bacterias mediante una purificación por lisis alcalina y se comprobó su identidad al digerirlo con las enzimas utilizadas en la estrategia de clonación. Esta digestión permitió liberar el gen de la adhesina de 1.7 Kb de peso molecular, del vector de 5.4 Kb (figura 1) y así seleccionar los cultivos bacterianos que tenían la construcción de interés. Para corroborar la identidad de la construcción *pcDNA-Ehadh112*, una muestra se secuenció empleando un oligonucleótido que permitió leer la secuencia desde el extremo de clonación 5' y 200 pb más, cadena abajo (resultados no mostrados). El segundo plásmido vacunal se construyó con el gen de la subunidad menor de la proteína de superficie amibiana de 112 kDa, el de la proteasa. Al plásmido resultante se le denominó *pcDNA-Ehcp112*. Dicha construcción se utilizó para transformar bacterias de *E. coli DH5α* competentes. El plásmido recombinante se extrajo de las bacterias mediante una purificación por lisis alcalina y se comprobó su identidad por análisis de restricción con las enzimas utilizadas en la clonación. Esta digestión permitió liberar el gen de la cisteín proteasa de 1.3 Kb de peso molecular, del vector de 5.4 Kb (figura 2) en los casos en los que se encontró la construcción de interés. Con el objetivo de corroborar la identidad del plásmido *pcDNA-Ehcp112*, una muestra del ADN se sometió a análisis en un equipo de secuenciación automática, de forma similar a como se hizo para el plásmido anterior (resultado no mostrado).

**Ejemplo 2.** Transfección de células L929 y expresión *in vitro* de los polipéptidos Ehadh112 y Ehcp112.

Se emplearon las construcciones plasmídicas descritas en el ejemplo 1.

Los ensayos de transfección se realizaron según los protocolos de la Guía de transfección de Gibco, BRL. Las células se crecieron en placas de 35 mm (COSTAR, EUA) hasta lograr una confluencia celular entre el 60 y el 80 %. Por cada placa se utilizaron 2 µg del ADN plasmídico a transfectar, diluido en 100 µl de medio (DMEM, EUA) libre de suero bovino fetal (Gibco, BRL, EUA) y 25 µl de lipofectamina (Gibco, BRL, EUA) diluida en 100 µl de medio libre de suero. Las placas se incubaron 6 horas a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. A las 24 horas del comienzo de la transfección se reemplazó el medio de las placas por medio fresco completo (DMEM, con suero fetal al 10 %, 100 µg/ml de ampicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) y 48 horas después se le adicionó al cultivo celular 1µg/ml de medio DMEM, del antibiótico de selección, geneticina (Gibco, BRL, EUA). Para los ensayos de RT-PCR se emplearon cultivos de células crecidas en placas de 100 mm hasta un 80-90 % de confluencia, a partir de

los cuales se extrajo el RNA con trizol: fenol- isocianato de guanidinio. Al final se disolvió en 30 µl H<sub>2</sub>O-DEPC y se incubó con Dnasa libre de Rnasa, (RQI Promega) en un baño térmico a 37 °C durante 30 min. Para determinar la concentración de la muestra se leyó la absorbancia a 260 nm. El RNA se guardó precipitado con etanol al 70 % a -70 °C, en alícuotas de 5 µl. para la síntesis de cDNA se emplearon tubos de PCR a los que se le adicionaron 5 µg de RNA total, 100 ng del oligo en antisentido en un volumen final de 12 µl y los tubos se incubaron a 70° C por 10 min. Al término de este tiempo se devolvieron en baño de hielo y se le adicionaron 4µl de First Strand Buffer Kit 5X (Kit), 2 µl de 0.1 M de DTT (Kit), 1 µl de 10 mM de dNTP Mix (Kit). La mezcla se homogeneizó y se puso a incubar a 42° C por 2 min. Entonces se le agregó 1 µl (5 unidades) de la enzima SuperScript II (Gibco- BRL Kit), y se dejó incubando durante 50 min a 42° C. La reacción se detuvo al colocar los tubos a 70° C por 15 min.

El producto de la reacción se trató con RNasa H. Finalmente las muestras se guardaron a -20° C.

Las secuencias de los oligos en antisentido utilizados fueron:

15 *Ehadh112*: 5'- TGCTTGAGTATAAGCAG 3'

*neo<sup>r</sup>*: 5' TTAGGAGAACTCGTC -3'

Por cada fragmento de ADN que se quiso amplificar se agregaron 10 µl de Buffer 10 X de la Taq Polimerasa, 8 µl de MgCl<sub>2</sub>, 200 ng, del oligo en sentido y 200 ng del oligo en anti-sentido, 2 µl del producto de la reacción de la RT-PCR, 2 µl de dNTP y 0.6 µl (5 U/µl) de la enzima Taq polimerasa en un volumen final de 100 µl. La temperatura inicial de desnaturalización del ADN que se utilizó fue de 94° C por 5 min, luego siguieron 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento de los oligos y extensión (94° C por 30 seg, Tm por 35 seg y 72° C por 1 min, respectivamente. Se programaron 7 min de extensión final a 72° C y una temperatura de mantenimiento de 4° C.

25 Las secuencias de los oligos en sentido que se utilizaron fueron:

*Ehadh112*: 5'- ACTTGATTTTGAAAAGG -3'

*neo<sup>r</sup>*: 5' ATGATTGAACAAGATGG -3'

Para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta los cultivos celulares de línea L-929 transfectados se crecieron sobre cubres cero durante 24 horas y las células se fijaron con una solución de acetona-metanol (v/v) fría que se dejó actuar durante 2 min. Las células fijadas se incubaron durante 1 hora a 37° C con suero de hámster inmunizados con las construcciones plasmídicas en estudio, a una dilución 1:20. Transcurrido este tiempo los cubres se incubaron con el segundo anticuerpo anti-IgG de hámster obtenido en cabra y acoplado a fluoresceína, a una dilución 1:200. Finalmente se examinaron a través de un microscopio Nikon Diaphot 200

acoplado a un sistema de barrido de laser confocal MRC 1024 (BioRad, EUA). Una vez obtenidos los plásmidos vacunales y antes de comenzar la inoculación directa en el animal de experimentación, para demostrar *in vitro* que estas construcciones eran capaces de replicarse en una célula eucariótica, de transcribirse y por último de expresar el producto génico que cada una tenía clonado, se seleccionaron fibroblastos de ratón como sistema eucariótico de vida. Se seleccionaron las clonas que sobrevivieron a dos semanas de tratamiento sostenido, en el momento que los cultivos no transfectados morían bajo la misma concentración del agente selectivo. El empleo de geneticina permitió la selección de las células que lograron incorporar los plásmidos de interés. Las células no transfectadas murieron por carecer de dicho gen.

A partir del RNA de las células transfectadas, se demostró que ambos cultivos habían sido transfectados exitosamente y que en ellos se estaba produciendo la transcripción del gen de la adhesina. El transcrito esperado según el par de oligonucleótidos que se utilizó era de aproximadamente 600 pb. En la electroforesis del producto de la RT-PCR (figura 3) se observó de manera selectiva esta banda para el RNA del cultivo trasfectado con *pcDNA-Ehadh112*.

Se hicieron crecer sobre cubre objetos cultivos de fibroblastos de la línea L929 transfectados de forma independiente con los plásmidos *pcDNA-Ehcp112*, *pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA<sub>3</sub>*, para probar mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta la presencia de las proteínas amibianas y determinar su localización.

Como resultado de este ensayo se observó una tinción fluorescente en la superficie de las células transfectadas con los plásmidos que tenían insertados los genes amibianos (*pcDNA-Ehcp112*, *pcDNA-Ehadh112*), y no se obtuvo fluorescencia en estas mismas células a las que, como control, no se les adicionó el primer anticuerpo, ni en las que se transfectaron con el vector *pcDNA<sub>3</sub>*. (figura 4).

Evaluamos la capacidad de los plásmidos de transcribir y expresar sus genes en células eucarióticas de fibroblastos murinos L929, como primer paso, antes de estudiar la respuesta inmune que sus productos génicos fueran capaces de inducir.

Los fibroblastos se transfectaron exitosamente con los dos plásmidos de forma independiente. Se demostró la presencia del transcrito para el gen de la adhesina y se observó por inmunofluorescencia la existencia de una proteína de membrana en la superficie de los fibroblastos transfectados con ambos plásmidos.

Ambos genes fueron clonados incluyendo las secuencias de anclaje a membrana y, aunque para el gen de la adhesina no se encontró ninguna secuencia con las características del péptido líder, al menos en el caso de la proteasa, ésta se incluyó.

**Ejemplo 3.** Estudio de la respuesta inmune humoral inducida en hamsters con el plásmido *pcDNA-Ehadh112*.

Se utilizó el plásmido obtenido y purificado como se muestra en el ejemplo 1. Para este experimento se utilizaron hámsteres machos de 4 a 5 semanas de edad, con los cuales se formaron 10 grupos de 8 animales cada uno. Las inmunizaciones se realizaron cada 20 días, intradérmicamente en la base de la cola. En todos los casos el inóculo tuvo un volumen de 100 µl y se aplicó 3 veces con jeringuillas de 1ml.

Con el plásmido *pcDNA<sub>3</sub>-Ehadh112*, se inocularon 4 grupos con las siguientes dosis 5 µg, 50 µg, 75 µg y 100 µg, con el plásmido *pcDNA<sub>3</sub>-Ehcp112*. Para los controles se seleccionaron 2 grupos uno se inoculó con el vector *pcDNA<sub>3</sub>* utilizado en la construcción de los plásmidos anteriores, y

el otro grupo con PBS estéril, solución utilizada como vehículo de los inóculos. Las extracciones de sangre se realizaron por punción del seno retro-orbital cada 10 días, se extrajo el suero y se guardó a -20° C hasta su uso. Los sueros fueron analizados mediante Western blot frente a extractos de proteínas totales de amibas, los cuales fueron obtenidos por el método descrito por

Avila y colaboradores (Ávila, E.E., Sánchez-Garza, M. y Calderón, J. 1985. *Entamoeba histolytica* and *E. invadens* sulphhydryl-dependent proteolytic activity. *J protozool.* 32:163-166) y Calderón y Avila (Calderón, J. Y Avila, E. 1986. Antibody induced caps in *Entamoeba histolytica*: isolation and electrophoretic analysis. *J. Infect. Dis.* 153:184-193). La separación electroforética se realizó según el método descrito por Laemmli (Laemmli, U.K. 1970. Cleavage

of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* 277:680-685) y modificado por Avila (Ávila, E.E 1982. Identificación de las proteínas de membrana plasmática y del "cap" inducido por anticuerpos en *Entamoeba histolytica*. Tesis de maestría en Ciencias (Biología Celular) Centro de investigación y Estudios Avanzados del IPN. México, D.F). Se utilizaron geles al 12 %. Los geles se corrieron a 100 V. Para la transferencia de las

proteínas separadas por la electroforesis se utilizó la técnica descrita por Towbin y col. (Towbin, H., Staehelin, T. Y Gordon, G. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354). La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada PBS-BSA al 2 %, se incubó con el primer anticuerpo (monoclonal de ratón IgM dirigido contra la proteína de 112 kDa o suero

inmune de hámster) toda la noche a 4° C en agitación suave. Los segundos anticuerpos específicos (anti-IgM de ratón peroxidado y anti-IgG de hámster peroxidado, Zymed, EUA), a temperatura ambiente, en agitación durante 2 horas. El anticuerpo no fijado se eliminó mediante dos lavados consecutivos de una solución amortiguadora de fosfatos 20 mM (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.4 y NaCl 150 mM) y una vez con una solución amortiguadora de fosfatos

50 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  25 mM y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  25 mM pH 7.4). El reconocimiento de las proteínas por los antisueros se reveló 4-cloro-1-naftol (Sigma, EUA). Los ensayos de ELISA se realizaron por un método similar al descrito por Zhang y Stanley, (Zhang T, Stanley SL. DNA vaccination with de serine rich *Entamoeba histolytica* protein (SREHP) prevents amebic liver abscess in rodent models of disease. *Vaccine*. 2000; 18: 868-874). Las placas de 96 pozos (COSTAR; EUA) se recubrieron con 50  $\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^4$  amibas) de una solución de trofozoítos inactivados por calor, en PBS durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente se realizaron 4 lavados con 150  $\mu\text{l}$ /pozo de PBS-tween al 0.05 % y se adicionó a cada pozo 100  $\mu\text{l}$  de la solución de bloqueo (PBS-BSA al 2 %), las placas se incubaron 1h a 37° C. Se le adicionó entonces el primer anticuerpo, 50  $\mu\text{l}$  de suero de hámsteres en una dilución 1:500 en PBS-BSA al 1% a 4° C durante toda la noche. Se le adicionó 50  $\mu\text{l}$  del segundo anticuerpo, anti IgG de hámster peroxidado a una dilución 1:2 000 en PBS-BSA al 1 %. Las placas se incubaron 1h a temperatura ambiente y luego se lavaron exhaustivamente y se revelaron con orthofenilendiamina. La reacción se detuvo con 25  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 2.5 M. Los resultados de la reacción colorimétrica se leyeron en un lector de ELISA a una densidad óptica de 492 nm. Todas las muestras se aplicaron por duplicado.

Los sueros de los animales inmunizados con pcDNA-Ehadh112 reconocieron una banda de 120 kDa de talla molecular, coincidente con la altura de la banda reconocida por un anticuerpo monoclonal anti-112. Se observaron otras señales de reconocimiento inespecífico. La mezcla de sueros del grupo control no dio señal a esta altura, tampoco lo hizo el suero preinmune (figura 5). Por otra parte, el suero de los hámsteres inoculados con el DNA de interés reconoció a la adhesina recombinante de 31 kDa, que conserva el dominio de adhesión y la capacidad de ser reconocida por el anticuerpo monoclonal. El suero pre-inmune no dio señal de reconocimiento frente a la proteína recombinante. A los hámsteres inmunizados con las diferentes dosis del plásmido pcDNA-Ehadh112, se les tomó muestras periódica de suero y dicho suero se usó para determinar, mediante un ensayo de ELISA, la presencia de anticuerpos IgG contra proteínas de membrana de *E. histolytica* (figura 9).

El resultado de este experimento mostró que el nivel de anticuerpos séricos anti-amibianos comportaba una tendencia creciente, sin embargo, no se encontró una diferencia significativa entre los niveles registrados en el momento cero del experimento y los detectados en las diferentes extracciones. Sólo el suero de la última extracción, tomado antes del sacrificio y transcurrida una semana del reto, mostró diferencias con los niveles de los sueros preinmunes respectivos.

**Ejemplo 4.** Inmunofluorescencia sobre trofozoítos de amibas.

Se emplearon sueros inmunes obtenidos de la forma descrita en el ejemplo 3. Los trofozoítos de la cepa HM1-IMSS se crecieron sobre cubre-objetos durante 24 horas y se lavaron con PBS para retirar el medio de cultivo, se fijaron con paraformaldehído al 2,5 % (Sigma, EUA) disuelto en PBS, se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.5 % (Sigma, EUA) durante 10 min. a temperatura ambiente. Sobre las células ya fijadas se realizó el ensayo de inmunofluorescencia indirecta tal como se describió anteriormente en el ejemplo 2. Para ver el reconocimiento de una proteína de superficie en la amiba por el suero inmune se incubaron trofozoítos de amiba de la cepa HM1-IMSS, con suero inmune de hámsteres inoculados con el plásmido *pcDNA-Ehadh112* y con suero control (de animales inoculados con el vector). Las láminas se observaron a través del microscopio confocal. Como resultado de este ensayo de inmunofluorescencia indirecta, se observó que los trofozoítos incubados con los sueros control no mostraron fluorescencia y que los que fueron incubados con suero inmune, después de la tercera extracción, mostraban fluorescencia, especialmente en la superficie de las amibas (figura 6).

Ejemplo 5. Estudio de la respuesta inmune humoral inducida en hamsters con el plásmido *pcDNA-Ehcp112*.

Se utilizó el plásmido obtenido y purificado como se muestra en el ejemplo 1. Utilizamos el mismo protocolo de inmunización y muestreo sanguíneo descrito en el ejemplo 3. Con el plásmido *pcDNA<sub>3</sub>-Ehcp112*, se inocularon 3 grupos con las dosis 50 µg, 100 µg y 200 µg. Los procedimientos utilizados para los ensayos de Western blot y ELISA fueron los mostrados en el ejemplo 3. Se inmunizaron hámsteres con diferentes dosis para estudiar la inducción de una respuesta inmune por la expresión *in vivo* de la proteasa amibiana de 112 kDa. Cuando se ensayó mediante Western blot el suero de los hámsteres inmunizados con *pcDNA-Ehcp112*, se obtuvo una señal de reconocimiento que coincidió con la detectada en el carril correspondiente al control positivo y que no se detectó cuando el suero pre-inmune funcionó como primer anticuerpo (figura 7).

Con los sueros extraídos cada 10 días desde el inicio del esquema de inmunización pudimos realizar, mediante ELISA, un estudio del comportamiento de los niveles de anticuerpos IgG a lo largo del experimento (figura 10). Como resultado de este experimento, se observó una respuesta en la que, después de un primer ascenso del título de anticuerpos, éste cae para volver a ascender a niveles algo superiores. Se registraron diferencias significativas entre el suero preinmune y el obtenido al finalizar el experimento. No ocurrió lo mismo con los sueros de extracciones anteriores. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles alcanzados entre las diferentes dosis ensayadas.

**Ejemplo 6.** Estudio de la respuesta inmune humoral inducida en hamsters con los plásmidos *pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA-Ehcp112*.

Se utilizó el plásmido obtenido y purificado como se muestra en el ejemplo 1. Utilizamos el mismo protocolo de inmunización y muestreo sanguíneo descrito en el ejemplo 3. En este estudio se utilizó una mezcla plasmídica consistente 50 µg de cada uno. Para los ensayos de Western blot y ELISA se emplearon los procedimientos utilizados en el ejemplo 3. El suero inmune que se extrajo de estos animales se empleó para detectar, mediante un ensayo de Western blot, la presencia de anticuerpos IgG específicos contra la proteína amibiana (Figura 8). La mezcla de los sueros de los animales inmunizados con los dos plásmidos dio una señal de reconocimiento a la altura de la observada en el control positivo, la cual no se observó en los sueros pre-inmunes. El suero extraído cada 10 días a estos animales nos permitió hacer un estudio de la cinética de la respuesta humoral. Mediante ELISA, se hicieron las determinaciones de los niveles de anticuerpos IgG séricos capaces de reconocer proteínas de trofozoítos intactos, bajo el mismo procedimiento que en los estudios de cinética anteriores (figura 11). Los resultados nos permitieron observar un comportamiento bifásico en la respuesta humoral de este grupo de animales. Tras un incremento en los títulos de anticuerpos durante las dos primeras extracciones, se produjo una reducción detectada a los 30 días de iniciado el esquema de inmunización, es decir, después de la segunda dosis, para volver a ascender a continuación de la tercera y hasta el final del estudio. El análisis de los datos reveló una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de anticuerpos que se encontraron en el suero pre-inmune y los alcanzados en cada una de las extracciones posteriores, desde la realizada a los 10 días de la primera dosis inoculada, hasta la realizada a los dos meses de comenzado el estudio. Se encontró que la extracción del día 30 del esquema constituyó la excepción en este aspecto, al no reportarse diferencia significativa con el suero preinmune. Los resultados corroboraron los alcanzados con el ensayo de Western blot sobre la inmunogenicidad de las proteínas amibianas. Se observó que los títulos de anticuerpos de IgG aumentaban en la medida en que los animales iban recibiendo las inmunizaciones. De igual forma, demostraron la eficacia de la vía seleccionada y del rango de dosis ensayado para estudiar la inducción de una respuesta inmune. Estos resultados sugirieron, en primer lugar, que los plásmidos *pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA-Ehcp112* inyectados intradérmicamente en los hámsteres, transfectaron células del huésped, probablemente a queratinocitos y quizá también a células del sistema inmune cutáneo. En segundo término, que estas células lograron la expresión endógena, tanto de la adhesina como de la proteasa amibianas. En tercer lugar, indicaron que dichas construcciones, en las dosis escogidas y por la vía de administración seleccionada, resultaron inmunogénicas en el hámster. Y, por último, que la

mezcla de ambos plásmidos para su administración simultánea no abate la respuesta observada con cada uno de ellos de forma independiente.

**Ejemplo 7.** Estudio de la respuesta inmune celular inducida por el plásmido *pcDNA-Ehadh112*.

Para estudiar la respuesta inmune mediada por células se realizó un ensayo de linfoproliferación celular empleando los plásmidos descritos en el ejemplo 1 y el esquema de inmunización descrito en el ejemplo 2. Los ensayos de linfoproliferación se realizaron según describieron Lotter y colaboradores (Lotter H, Zhang T, Seydel KB, Stanley SL Jr; Tannich E.. Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170 kDa lectin conferring antibody-mediated protection against invasive amebiasis. *J Exp Med* 1997; 185: 1793-1803). Los mismos se

efectuaron con células totales de bazo de los hámsteres en estudio. Se emplearon linfocitos extraídos de los bazos de los animales en estudio y medio DMEM suplementado con suero fetal.

Los linfocitos se ajustaron a  $2 \times 10^6$  cel/ml con RPMI completo. Como antígenos se usó la Concanavalina A (Pharmacia, Sweden) a 0.25 mg/ml (mitógeno inespecífico) y amibas de la cepa *HMI-IMSS* inactivadas por calor y ajustadas con DMEM completo a  $4 \times 10^5$  cel/ ml. En

placas de cultivo celular de 96 pozos y fondo plano (COSTAR; EUA) se colocaron 100 µl/pozo de la suspensión de linfocitos de cada hámster y éstas se pusieron en contacto con 3 concentraciones de antígenos específicos ( $4 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$  trofozoítos/pozo) y con 0.25 mg/ml de Concanavalina A. Todos los estudios se hicieron por duplicado. Las placas se incubaron durante 72 h a 37° C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y transcurridas las 56 primeras horas

se adicionaron 20 µl/pozo (1 µCi ) de una solución de timidina tritiada en DMEM (0.5 mCi /10 ml DMEM). Una vez cumplido este tiempo, las placas se leyeron. Con el objetivo de estudiar el comportamiento del componente celular de la respuesta en los animales inmunizados con el plásmido *pcDNA-Ehadh112*, realizamos ensayos de linfoproliferación celular (Figura 12). Los resultados indican que la construcción que porta el gen de la adhesina amibiana, resultó

inmunogénica al inyectarla intradérmicamente en el hámster, originando una respuesta inmune con participación del componente celular. Las mejor cantidad de trofozoítos inactivados para las re-estimulaciones in vitro, fue 10 000 amibas por pozo. El análisis de los datos se realizó con los valores de la relación CPM alcanzada por las células del control control contra CPM de las células del grupo inmune, para cada grupo. Se evidenció que los grupos de animales que

recibieron las dosis menores del plásmido (5 y 50 µg), respondieron menos que los de más altas dosis, en una relación directa. El grupo inmunizado con la dosis de 75 µg, mostró un índice de estimulación por encima de 8 y el grupo inmunizado con la dosis máxima, por encima de 11, mientras que los índices de los grupos de bajas dosis estuvieron por debajo de 3. El grupo

control, que recibió altas dosis del vector y fue igualmente retado, no mostró proliferación linfocitaria.

**Ejemplo 8.** Estudio de la respuesta inmune celular inducida por el plásmido *pcDNA-Ehcp112*.

Se realizó un ensayo de linfoproliferación celular empleando los plásmidos descritos en el ejemplo 1 y el esquema de inmunización descrito en el ejemplo 2 el procedimiento seguido fue el mismo descrito en el ejemplo 7. Para estudiar en los animales inmunizados el componente celular de la respuesta inmune, al finalizar el experimento se les extrajo el bazo y los esplenocitos fueron empleados en un ensayo de linfoproliferación. Como control del experimento se utilizó un grupo de animales inmunizado con 100 µg del vector y retado igual que los grupos problemas (figura 13). El análisis de los datos se hizo con los valores de la relación CPM alcanzada por las células del control contra CPM de las células del grupo inmune, para cada grupo. Los animales inmunizados con 200 µg tuvieron una respuesta que duplicó la encontrada en los hámsteres inmunizados con 100 µg. No obstante, los linfocitos de ambos grupos mostraron proliferación celular a la estimulación *in vitro* que no se encontró en el grupo control. Por otra parte, los índices más altos se alcanzaron cuando se re-estimuló con 10000 trofozoítos por pozo, 4.1 para la dosis de 100µg y 8.3 para la de 200µg. Se vio que el valor de esta relación para los que recibieron 100 µg, disminuía a 3.4 cuando ensayamos con 20000 trofozoítos, y a 2.2 cuando se duplicó la concentración de amibas. Para los que inoculamos con 200µg de *pcDNA-Ehcp112*, los valores de la relación también disminuyeron en la medida que se aumentaba la concentración de trofozoítos, fue de 5.1, para las estimulaciones con 20000 y de 4.3 para las que se realizaron con 40000 amibas.

**Ejemplo 9.** Estudio de la respuesta inmune celular inducida por los plásmidos *pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA-Ehcp112*.

Se realizó un ensayo de linfoproliferación celular empleando los plásmidos descritos en el ejemplo 1 y el esquema de inmunización descrito en el ejemplo 2, el procedimiento seguido fue el mismo descrito en el ejemplo 7. El análisis de la respuesta celular también fue hecho en este grupo siguiendo el mismo protocolo que en los estudios de cada plásmido de forma independiente (figura 14). El resultado de este experimento evidenció una proliferación de células T del grupo inmunizado con respecto al control, con una relación de proliferación del grupo control con el grupo inmune de 9:1. También se pudo observar que la concentración de 10000 trofozoítos por pozo fue la ideal para evidenciar este resultado. El estudio de la inmunogenicidad de estas proteínas amibianas expresadas en el hámster se hizo extensivo a la respuesta inmune celular mediante ensayos de linfoproliferación. Realizamos un análisis comparativo entre los grupos que recibieron los plásmidos de forma independiente, en las

diferentes dosis, y los que recibieron la mezcla de ellos. Los resultados de estos experimentos nos permitieron concluir que la intensidad de las respuestas encontradas tuvo una relación directa con las dosis ensayadas en cada grupo. Esto se cumplió para los dos plásmidos en estudio, encontrándose los mayores valores de CPM en las células de los animales que recibieron 100µg del plásmido *pcDNA-Ehadh112* y las de los que recibieron 200 µg de *pcDNA-Ehcp112*. No obstante, comparativamente la respuesta proliferativa fue mayor en el grupo inmunizado con el fragmento de gen de la adhesina que con el gen de la proteasa. El primero alcanzó cuentas superiores a las 11000, para una dosis de inmunización de 100 µg, mientras que el segundo, para una dosis de 200 µg, alcanzó valores inferiores a 5 000 CPM. Si analizamos los valores correspondientes al grupo inmunizado con una mezcla de 50 µg de cada uno de los plásmidos en estudio, constatamos que los valores de CPM (6829) fueron superiores a los alcanzados para la dosis de 50 ug del grupo inmunizado con el *pcDNA-Ehadh112* (1599 CPM), y mayores incluso que para el que recibió 200 ug del *pcDNA-Ehcp112* (4812 CPM). Este análisis nos sugiere la existencia de un sinergismo en la respuesta celular, pues la combinación de ambos plásmidos indujo una respuesta linfoproliferativa mayor que la administración independiente de cada uno de ellos, incluso en dosis superiores.

**Ejemplo 10.** Determinación de la protección inducida por los plásmidos *pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA-Ehcp112*, al reto intra-portal en los animales en estudio.

Se emplearon los plásmidos descritos en el ejemplo 1 y el esquema de inmunización descrito en el ejemplo 2. Una vez terminado el esquema de inmunización descrito en el ejemplo 2 los hámsteres se retaron con amibas virulentas de la cepa HM1:IMSS. Bajo el efecto de anestesia, a los animales se les practicó una incisión media longitudinal que permitiera desplazar las asas intestinales hasta poder visualizar el hilio hepático. Entonces 100 µl ( $1.5 \times 10^5$  trofozoítos) de una dilución de amibas virulentas se inyectaron en la Porta. La hemorragia se detuvo con gelfoam. Las asas se devolvieron a la cavidad intestinal y la pared abdominal se cerró con ceda 3.0. A la semana del reto los animales se sacrificaron y se les extrajeron sus hígados para fotografiarlos y analizar el por ciento de daño hepático. Con el objetivo de evaluar el grado de protección que confería la inmunización realizada, los animales se retaron con trofozoítos virulentos inyectados directamente en la vena porta, se sacrificaron a los 7 días y se hizo el cálculo del porcentaje de tejido hepático dañado con respecto al peso total del órgano. Como se puede observar en la figura 16, las inmunizaciones realizadas con los plásmidos inyectados de forma independiente y en las diferentes dosis no lograron reducir el daño hepático provocado por la infestación amibiana; no se encontraron diferencias significativas entre estos grupos. Sin embargo el grupo inmunizado con la mezcla de estas dos construcciones plasmídicas logró una reducción

estadísticamente significativa con respecto al grupo control. La reducción del daño fue del 50% y fue notable tanto en la disminución del área con abscesos como en la disminución del peso total del órgano. La inmunización con ADN desnudo empleando los dos genes que codifican para la adhesina amibiana de 112 kDa, inoculados de forma independiente y combinada, fue capaz de generar una respuesta inmune tanto de tipo humoral como celular; sin embargo, faltaba evaluar la capacidad protectora de dicha respuesta. Para ello, realizamos los estudios de virulencia *in vivo* en hámsteres jóvenes. Se comprobó que en ninguna de las dosis estudiadas para los plásmidos administrados de forma independiente (*pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA-Ehcp112*) se logró protección. Sin embargo, para el grupo que recibió la mezcla de ambos plásmidos, se logró una protección parcial del 50%. Los animales presentaron reducción del número y tamaño de los abscesos. Estos bajos niveles de protección encontrados, con respecto a otros estudios similares, pueden deberse, en parte, al modelo de amibiasis hepática utilizado. Nosotros inoculamos directamente en la vena porta 150000 trofozoítos virulentos recientemente pasados por el hígado de hámsteres.

#### **Ejemplo 11. Estudio de virulencia in vitro.**

Con los sueros inmunes obtenidos según se describió en el ejemplo 2, se realizaron estudios de inhibición de la adhesión a eritrocitos humanos y a células obtenidas de riñón de perro (MDCK). Los eritrocitos humanos se obtuvieron por punción venosa y se utilizó solución de Alsever como anticoagulante. (Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H. (1977) Reagents. Cap IV In: Methods in Immunology. Benjamin (Ed) Inc. Reading, Massachusetts 3rd edition). La muestra de sangre se centrifugó a 1500 x g durante 10 min, después los eritrocitos se lavaron tres veces con la misma solución y se resuspendieron en medio TYI-S-33 sin suero. Los eritrocitos se utilizaron frescos o hasta 5 días después de su extracción. El estudio se realizó según lo reportado por García Rivera y colaboradores (García Rivera G, Rodríguez MA, Ocadiz R, Martínez-López C, Arroyo R, González Robles A, Orozco E. *Entamoeba histolytica*: a novel cystein protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. *Molecular Microbiology* 1999; 33: 556-568). Cada ensayo se realizó por triplicado. El 100% de adhesión se tomó en los casos que las amibas no estuvieron en contacto con suero de hámsteres. De forma similar a como se procedió en el experimento anterior, los trofozoítos virulentos de la cepa HM1-IMSS se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento y se ajustaron en medio de cultivo TYI-S-33 sin suero a una concentración de  $1 \times 10^6$  trofozoítos /ml; 600 µl se incubaron con anti-suero de hámsteres en una dilución 1:250 durante 20 min a 4° C, en tubos Falcons de 15 ml. Posteriormente el contenido de cada tubo se adicionó sobre monocapas de células de la línea MDCK, crecidas en cámaras de 24 pozos. Las cámaras se colocaron en una incubadora a 37° C durante 3 horas, hasta que la

monocapa de células del pozo control, al que no se le adicionó suero, fue totalmente fagocitada por las amibas. Inmediatamente las cámaras se pasaron a 4° C durante 15 min y luego mediante lavados con PBS frío se desecharon todas las amibas. Los restos de las monocapas se tiñeron con 1 % de azul de metileno en amortiguador de boratos a 37° C durante 30 min. el color se midió en un espectrofotómetro a 660 nm (García Rivera G, Rodríguez MA, Ocádiz R, Martínez-López C, Arroyo R, González Robles A, Orozco E. Entamoeba histolytica: a novel cystein protease and an adhesin form the 112 kDa surface protein. Molecular Microbiology 1999; 33: 556-568).

Con el objetivo de continuar caracterizando la respuesta inmune, se realizaron ensayos de virulencia in vitro para determinar si estos anticuerpos eran capaces de bloquear la adhesión de amibas virulentas de la cepa HM1-IMSS a eritrocitos humanos. El estudio fue comparativo entre los animales inmunizados con los plásmidos que contienen los genes de la adhesina, de la proteasa, la mezcla de ambos genes y el grupo inmunizado con el vector. Hicimos una mezcla con los sueros de los animales que mejor respondieron a la inoculación de cada plásmido. Esto se hizo según los resultados de los ELISA realizados con los sueros de cada uno de los hámsteres (figura 15). Este experimento evidenció un efecto inhibitorio de los sueros inmunes sobre la adhesión de las amibas virulentas a los eritrocitos humanos, comparable con los valores de nuestro control positivo. El anticuerpo monoclonal logró una inhibición del 75.6%; el suero de los hámsteres inmunizados con el plásmido pcDNA.-Ehadh112 alcanzó un 66.9%; el suero del grupo inyectado con pcDNA.-Ehcp112 un 59.8% y, por último, el suero de los hámsteres inmunizados con ambos plásmidos alcanzó un 65.2%. El suero de los animales inoculados con el vector inhibió sólo un 6.8%. El análisis estadístico de los datos mostró que existe una diferencia significativa entre la inhibición de la adhesión lograda con el suero preinmune y con el control positivo del experimento, el anticuerpo Mab 5. De forma similar, se observó diferencia entre los valores alcanzados por los sueros preinmunes (A) y los sueros inmunes ( C, D, E), así como entre los sueros de los animales inmunizados con el vector (B) y los sueros C, D y E. Por otra parte, el estudio reveló que no existen diferencias significativas entre los diferentes grados de inhibición provocados por los sueros inmunes. (ver figura 16)

Para estudiar la capacidad de inhibir la adhesión amibiana que podían presentar los sueros inmunes de los tres grupos de animales inoculados con diferentes antígenos, realizamos el ensayo sobre eritrocitos humanos. Comprobamos que los tres grupos de sueros inmunes, los que recibieron los plásmidos pcDNA-Ehadh112, pcDNA-Ehcp112 y la mezcla de ambos, presentaron altos niveles de inhibición, comparables a los presentados por el mAb112; a pesar de los bajos niveles de anticuerpos alcanzados tras las inmunizaciones con ADN. Estos resultados

nos indican que, si bien la respuesta de anticuerpos fue baja, el grado de especificidad alcanzado no lo fue, pues anticuerpos en bajos títulos generados contra una sola de las adhesinas amibianas logró reducir en un alto porcentaje la adhesión a eritrocitos humanos.

La capacidad de estos anticuerpos séricos de inhibir, al menos parcialmente, el efecto citopático de las amibas sobre células de la línea MDCK, también fue estudiada. El estudio consistió en evaluar la destrucción que se producía sobre cada monocapa y, así, calcular la inhibición de este proceso en los pozos en los que se había adicionado suero, con respecto a los pozos en los que no. A estos últimos se les asignó el 100 % de destrucción celular (datos no mostrados). El resultado de este experimento arrojó un valor del 23.5% de inhibición para el anticuerpo monoclonal, uno del 2.2% para el suero pre-inmune y uno del 15.7% para el suero de los hámsteres inmunizados con el vector; que como ya comentamos constituyen nuestros controles. Los casos correspondientes a los sueros inmunizados con los plásmidos pcDNA-Ehadh112 y pcDNA-Ehchp112, arrojaron valores de 29.2% y 24.7 % respectivamente; los sueros de los hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos dio un valor del 33.7%. El análisis estadístico de los datos arrojó diferencias significativas entre la inhibición lograda por los sueros pre-inmunes y los inmunes, no así entre los sueros inmunes de los animales inyectados con los plásmidos pcDNA-Ehadh112, pcDNA-Ehchp112 y la mezcla a partes iguales de ambos. Estos resultados nos permiten concluir que los sueros inmunes de los hámsteres inmunizados con las construcciones plasmídicas fueron capaces de inhibir, al menos parcialmente, la destrucción que provocan las amibas sobre las monocapas celulares de la línea MDCK.

**Ejemplo 12.** Inmunización con una fragmento de la adhesina amibiana de 112 kDa.

A partir de los trabajos previos realizados por García-Ribera y col. En el cual obtuvieron un fragmento de 5.6 kb que contenía dos marcos de lectura abiertos que forman la proteína amibiana de superficie de 112 kDa (García-Rivera G, Avila A, Ayala P, Arrollo R, Rigother MC y Orozco C. 1997. Identification and localization of the cell binding domain in the 112 kDa adhesin gene of *Entamoeba histolytica*. Arch. Med. Res 28s:164-165), se obtuvo por restricción enzimática un fragmento del gen de la proteína Ehadh112, que codifica para el polipéptido que contiene los últimos 240 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Este fragmento fue clonado en el vector de expresión comercial pRSET (Invitrogen, USA) entre los sitios de restricción Pvu II y BamH I. El plásmido obtenido fue denominado pEhadh240.

El plásmido obtenido fue introducido en *E. coli* cepa BL 21(DE3) y a partir de los cultivos inducidos con isopropil  $\beta$ -D-galactopiranosido (IPTG) se realizó lapurificación de la proteína se realizó bajo condiciones desnaturizantes a través de una columna de afinidad Ni<sup>+2</sup>- NTA (Quiagen, EUA), siguiendo las indicaciones del manual del fabricante. Realizamos un

experimento en el cual se inmunizaron 6 hámsteres machos de 4 a 5 semanas de edad, con 120 µg de la proteína recombinante Adh112 por vía subcutánea, se les suministró 3 dosis a intervalos de 21 días y como control de este experimento empleamos 6 hámsteres inoculados con PBS. Una semana después de la última inmunización a todos los animales se les practicó un  
5 ensayo de reto con amebas virulentas. Durante todo el desarrollo del estudio los animales consumieron alimento y agua estériles. Las extracciones de sangre se realizaron por punción del seno retro-orbital cada 10 días, se extrajo el suero y se guardó a -20° C hasta su uso. El ensayo de reto fue como el descrito en el ejemplo 10. Los ensayos de Western blot y ELISA se realizaron según se describió en el ejemplo 2. Como resultado de este experimento se logró la  
10 inducción, expresión y purificación de una proteína recombinante de aproximadamente 31 kDa, la cual es reconocida por el anticuerpo monoclonal mAbAdh, y por el suero inmune de los hámsteres inmunizados con esta proteína en ensayos de Western blot como se muestra en la figura 17. El experimento de inmunización con la proteína recombinante, mostró que esta proteína resulta altamente inmunogénica resultado que se evidenció mediante ELISA,  
15 observándose una respuesta sérica IgG específica estadísticamente significativa (p .0000001) con respecto al grupo control. También se pudo apreciar un posible efecto booster al practicarle el reto a los animales inmunizados con la proteína, ya que se incrementó rápidamente el título de anticuerpos específicos, pudiéndose comprobar que esta respuesta también era estadísticamente diferente al grupo control (p .0000001) y a la respuesta obtenida para este mismo grupo antes  
20 del reto (p .000002). Estos resultados se muestran gráficamente en la figura 18. Además se obtuvo un 32.5% de protección contra los abscesos hepáticos amibianos. Estos resultados indican la posibilidad de obtener protección contra la infección amibiana en formulaciones que empleen un fragmento de esta proteína.

Ventajas de la solución propuesta.

25 Esta invención tiene las ventajas de utilizar como inmunógeno una proteína de la superficie de *Entamoeba histolytica* la cual posee tanto actividad de adhesina como de cistein proteasa, lo que permite combatir dos factores claves de virulencia de este protozoo parásito. Las formulaciones empleando esta proteínas, sus subunidades integrantes o los genes que la codifican permiten obtener en el hospedero tanto una respuesta humoral como celular específica. Al poder  
30 emplearse formulaciones de ADN, se le incorporan las ventajas propias de estos tipos de vacunas como son la relativa simplicidad de producción y el no requerir de cadenas de frío para su transporte lo que facilita una amplia cobertura sobre todo en las áreas donde esta enfermedad es endémica.

**Breve descripción de las figuras.**

**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de los productos del análisis enzimático del plásmido *pcDNA-Ehadh112*. Carriles: 1) Marcador de tamaño molecular DNA  $\lambda$  / Hind III, 2) plásmido linealizado con la digestión de la enzima *ApaI*, 3) plásmido sometido a doble digestión con las enzimas *ApaI* y *XbaI*, 4) vector *pcDNA<sub>3</sub>* utilizado para la clonación, previamente digerido con *ApaI* y *XbaI*, 5) fragmento del gen de la adhesina utilizado para la clonación, 6) Marcador de tamaño molecular IV (Boeringher).

**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de los productos del análisis enzimático del plásmido *pcDNA-Ehcp112*. Carriles: 1) marcador de tamaño molecular DNA  $\lambda$  / Hind III, 2) plásmido linealizado con la digestión de la enzima *BamHI*, 3) plásmido sometido a doble digestión con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*, 4) vector *pcDNA<sub>3</sub>* utilizado para la clonación, previamente digerido con *BamHI* y *EcoRI*, 5) gen de la cisteín proteasa utilizado para la clonación, 6) Marcador de tamaño molecular IV (Boeringher).

**Figura 3.** Electroforesis en geles de acrilamida de los productos de la reacción de RT-PCR partiendo del RNA total de células L929 transfectadas. Carriles: 1). marcador de tamaño molecular DNA  $\lambda$  / Hind III, 2) producto de la reacción de RT-PCR sobre RNA aislado de células L929 transfectadas con *pcDNA<sub>3</sub>* y amplificado con oligonucleótidos específicos para el gen *Ehadh112*. 3) producto de la reacción de RT-PCR sobre RNA aislado de células L929 transfectadas con *pcDNA-Ehadh112* amplificado con oligonucleótidos específicos para el gen *Ehadh112*.

**Figura 4.** Inmunolocalización de las proteínas amibianas *Ehadh112* y *Ehcp112*, en fibroblastos transfectados con los plásmidos *pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA-Ehcp112* respectivamente. Panel A. Imagen de transmisión del cultivo transfectado con *pcDNA<sub>3</sub>* (control). Panel B. Cultivo transfectado con *pcDNA<sub>3</sub>* e incubado con el primer y el segundo anticuerpo (control). Panel C. Cultivo transfectado con *pcDNA-Ehadh112* e incubado sólo con el conjugado fluoresceinado (control). Panel D. Cultivo transfectado con *pcDNA-Ehadh112* e incubado con ambos anticuerpos. Panel E. Cultivo transfectado con *pcDNA-Ehcp112* e incubado con los dos anticuerpos.

**Figura 5.** Reconocimiento de la adhesina de 112 kDa en extractos totales de proteínas amibianas por el suero de los hámsteres inmunizados con *pcDNA-Ehadh112*. Carriles: 1) mAb112, 2) suero

preimmune, 3 y 4) suero de hámster que recibió pcDNA<sub>3</sub>, 5-8) suero inmune de hámsteres que recibieron pcDNA-Ehadh112, 9) marcador de peso molecular (Gibco, EUA).

**Figura 6.** Inmunodetección de una proteína de superficie amibiana por el suero de los hámsteres inmunizados con *pcDNA-Ehadh112*. Panel A, trofozoítos incubados con una mezcla de sueros de animales que recibieron 2 dosis de 100 µg del vector pcDNA<sub>3</sub> (sueros controles). Panel B, trofozoítos incubados con una mezcla de sueros de animales que recibieron 2 dosis del plásmido *pcDNA-Ehadh112*.

**Figura 7.** Reconocimiento de la adhesina de 112 kDa en extractos totales de proteínas amibianas por el suero de los hámsteres inmunizados con pcDNA-Ehcp112. Carriles: 1) Reconocimiento de una proteína de 120 kDa. 2). Sueros pre-inmunes. 3, 4 y 5) suero inmune de hámsteres que recibieron pcDNA-EhCp112. 6) marcador de peso molecular(Gibco, EUA).

**Figura 8.** Reconocimiento de la adhesina de 112 kDa en extractos totales de proteínas amibianas por el suero de los hámsteres inmunizados con una mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA-Ehcp112*. Carriles: 1) Sueros pre-inmunes 2) sueros de hámsteres inmunizados con la mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA-Ehcp112* 3) Reconocimiento de una proteína de 120 kDa por el mAb112, control positivo.

**Figura 9.** Cinética de la respuesta de anticuerpos IgG séricos antiamibianos, inducidos en los hámsteres inmunizados con el plásmido *pcDNA-Ehadh112*. Los valores son medias de las D.O<sub>405</sub> alcanzadas por los sueros (1:500) de animales pertenecientes a un mismo grupo de dosis (n=8).

**Figura 10.** Cinética de la respuesta de anticuerpos IgG séricos antiamibianos, inducidos en los hámsteres inmunizados con el plásmido *pcDNA-Ehcp112*. Los valores son medias de las D.O<sub>405</sub> alcanzadas por los sueros (1:500) de animales pertenecientes a un mismo grupo de dosis (n=8).

**Figura 11.** Cinética de la respuesta de anticuerpos IgG séricos antiamibianos, inducidos en los hámsteres inmunizados con una mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA-Ehcp112*. Los valores son medias de las D.O<sub>405</sub> alcanzadas por los sueros (1:500) de animales pertenecientes a un mismo grupo de dosis (n=8).

**Figura 12.** Respuesta proliferativa de las células esplénicas de hámsteres vacunados con *pcDNA-Ehadh112*, a la estimulación con trofozoítos amibianos. Los valores representan la media de las CPM alcanzadas por las células de los hámsteres que conforman un mismo grupo de dosis (n=8).

5

**Figura 13.** Respuesta proliferativa de las células esplénicas de hámsteres vacunados con *pcDNA-Ehcp112*, a la estimulación con trofozoítos amibianos. Los valores representan la media de las CPM alcanzadas por las células de los hámsteres que conforman un mismo grupo de dosis (n=8).

10 **Figura 14.** Respuesta proliferativa de las células esplénicas de hámsteres vacunados con una mezcla de los plásmidos *pcDNA-Ehadh112* y *pcDNA-Ehcp112*, a la estimulación con trofozoítos amibianos. Los valores representan la media de las CPM alcanzadas por las células de los hámsteres que conforman un mismo grupo de dosis (n=8).

15 **Figura 15.** Comparación del efecto inhibitorio de los sueros inmunes sobre la adhesión amibiana a eritrocitos humanos.

**Figura 16.** Comparación de la capacidad protectora de las inmunizaciones con ADN desnudo entre los grupos en estudio.

20

**Figura 17.** Reconocimiento del polipéptido recombinante de 31 kDa de la adhesina de 112 kDa por el suero de los hámsteres inmunizados. 1) suero preinmune, 2) suero inmune de hámsteres que recibieron *pcDNA-Ehadh112*, 3) mAb112.

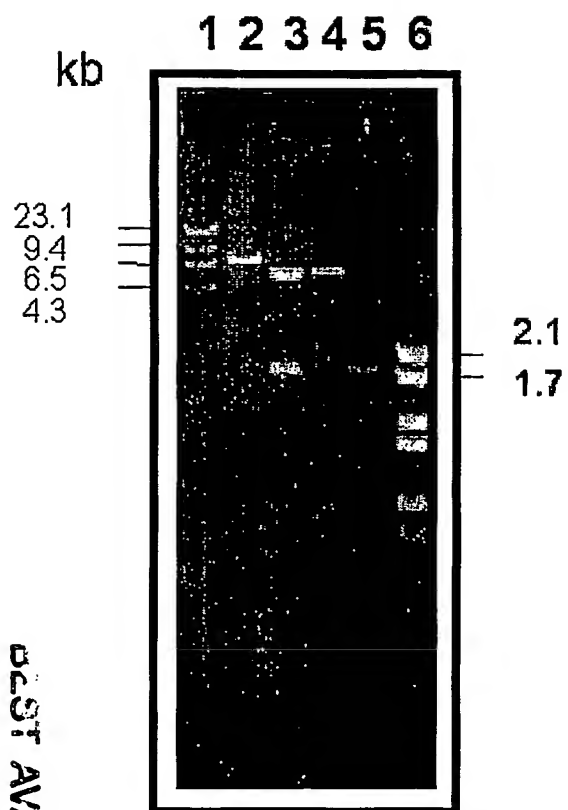
25 **Figura 18.** Respuesta inmune humoral de los Hamsters inmunizados con la proteína recombinante Ehadh240.

## REIVINDICACIONES

1. Composiciones vacunales para el control de la amibiasis caracterizadas porque comprenden como principio activo una proteína de superficie de 112 kDa de *Entamoeba histolytica* obtenida por vía natural, recombinante o sintética, péptidos derivados de la misma, así como los genes que la codifican o fragmentos de éstos, y un excipiente apropiado.
2. Composición vacunal según la reivindicación 1 caracterizada porque comprende como principio activo:
  - a) una subunidad con actividad de cistein proteasa codificada por el marco abierto de lectura de 1338 pares de base (ID. AAF04255.1),
  - b) una subunidad con actividad de adhesina codificada por el marco abierto de lectura de 2061 pares de base (ID. AAF04256.1), y
  - c) un vector adecuado para la inmunización con ADN.
3. Composición vacunal según la reivindicación 2 caracterizada porque estas subunidades por separado se encuentran en un rango de concentración entre 30 µg y 1 mg de proteínas.
4. Composición vacunal según la reivindicación 2 caracterizada porque comprende una mezcla de estas subunidades en proporciones iguales y en un rango entre 10µg y 1000 µg.
5. Composición vacunal según la reivindicación 1 caracterizada porque comprende como principio activo una mezcla de péptidos, en proporciones iguales en un rango de 0.1 mg – 1 mg del péptido .
6. Composición vacunal según la reivindicación 2 caracterizada porque comprende uno o más vectores adecuados para la inmunización con ADN, uno de los cuales contiene el gen de 1338 pares de bases (ID. AAF04255.1) correspondiente a la proteína con actividad de cistein proteasa o el gen de 2061 pares de bases (ID. AAF04256.1) correspondiente a la proteína con actividad de adhesina en un rango de concentración entre 5 µg y 800 µg de ADN.
7. Composiciones vacunales según la reivindicación 6 caracterizadas porque comprenden una mezcla de vectores adecuados para la inmunización con ADN, donde las construcciones genéticas se encuentran en proporciones iguales y en un rango entre 10 µg y 800 µg de ADN.

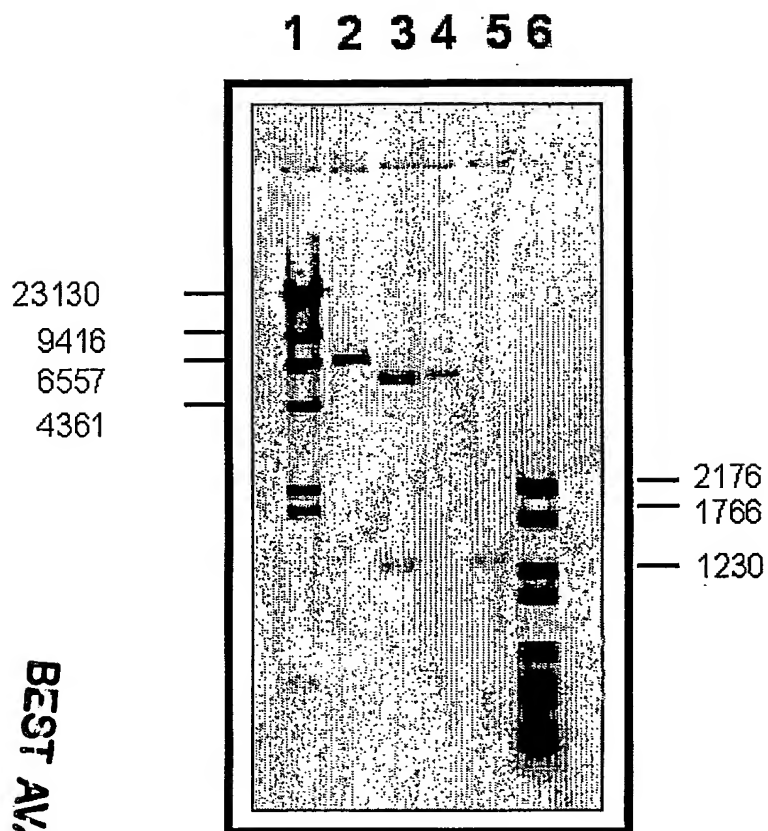
8. Composiciones vacunales según la reivindicación 7 caracterizadas porque uno de los vectores contiene un fragmento de ADN derivado del gen de 1338 pares de bases ID. SEC. No. 1) correspondiente a la proteína con actividad de cistein proteasa y otro vector contiene cualquier fragmento de ADN derivado del gen de 2061 pares de bases (ID. AAF04256.1) correspondiente con la proteína con actividad de adhesina.
9. Composición vacunal según reivindicación 8 caracterizada porque los vectores se encuentran en la mezcla en proporciones iguales y en un rango de concentraciones entre 30 µg y 1000 µg del vector.
10. Composición vacunal según la reivindicación 1 caracterizada porque comprende como principio activo un vector adecuado para la inmunización con ADN que contiene el gen de 1338 pares de bases (ID. AAF04255.1) correspondiente a la proteína con actividad de cistein proteasa y el gen de 2061 pares de bases (ID. AAF04256.1) correspondiente con la proteína con actividad de adhesina, separados por una secuencia de genes no codificante de 188 pares de bases.
11. Composición vacunal según la reivindicación 10 caracterizada porque el vector se encuentra en un rango entre 5 µg y 800 µg.
12. Composición vacunal según la reivindicación 1 caracterizada porque comprende como principio activo un vector vivo atenuado que expresa el producto del gen de 1338 pares de bases (ID. AAF04255.1) correspondiente a la proteína con actividad de cistein proteasa y el producto del gen de 2061 pares de bases (ID. AAF04256.1) correspondiente con la proteína con actividad de adhesina o fragmentos de los mismos.
13. Composición vacunal según la reivindicación 12 caracterizada porque el vector vivo atenuado se encuentra en un rango entre 20 µg y 100 µg por dosis.
14. Composición vacunal según la reivindicación 13 caracterizada porque el vector vivo es seleccionado del grupo de *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella sp*, *Vaccinia*, Adenovirus, Poliovirus, bacterias ácido lácticas y levaduras.
15. Composiciones vacunales según reivindicaciones de la 1 a la 14 caracterizadas porque se administran por cualquiera de las vías seleccionadas del grupo consistente en vía oral, intranasal, vaginal, rectal, intramuscular, subcutánea e intradérmica.
16. Uso de las composiciones vacunales de la 1 a la 15 para la profilaxis o tratamiento de la infección por *Entamoeba histolytica*.

Figura 1



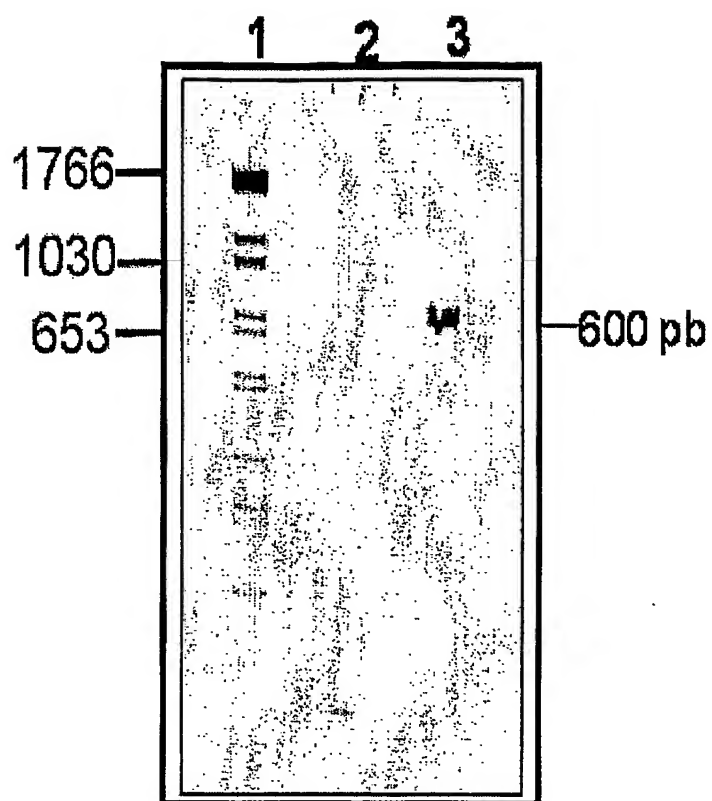
BEST AVAILABLE COPY

Figura 2



BEST AVAILABLE COPY

Figura 3



BEST AVAILABLE COPY

Figura 4

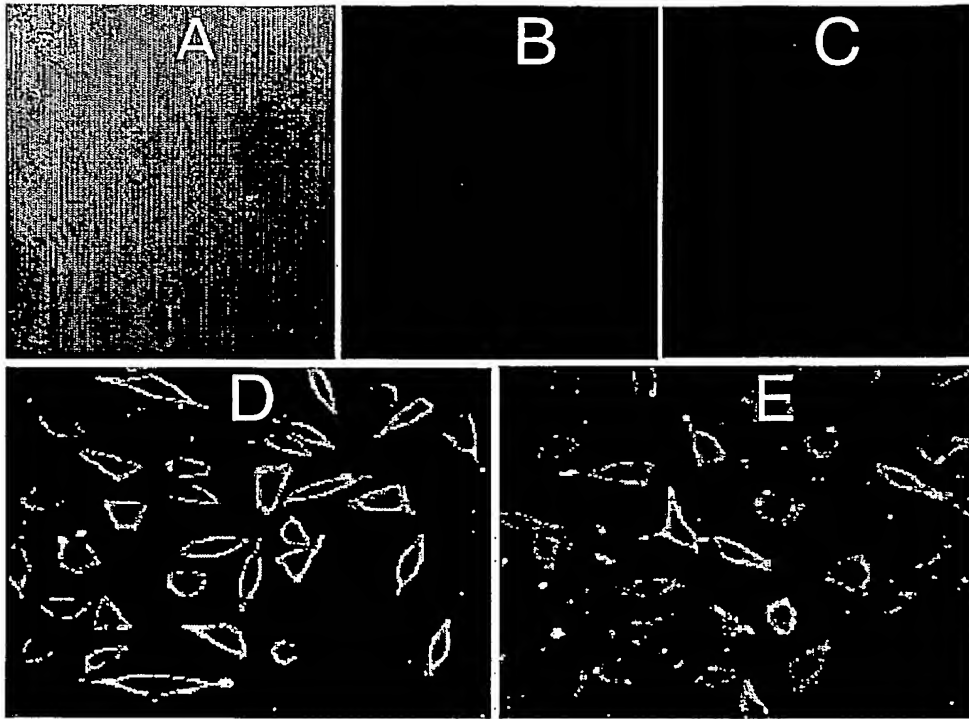
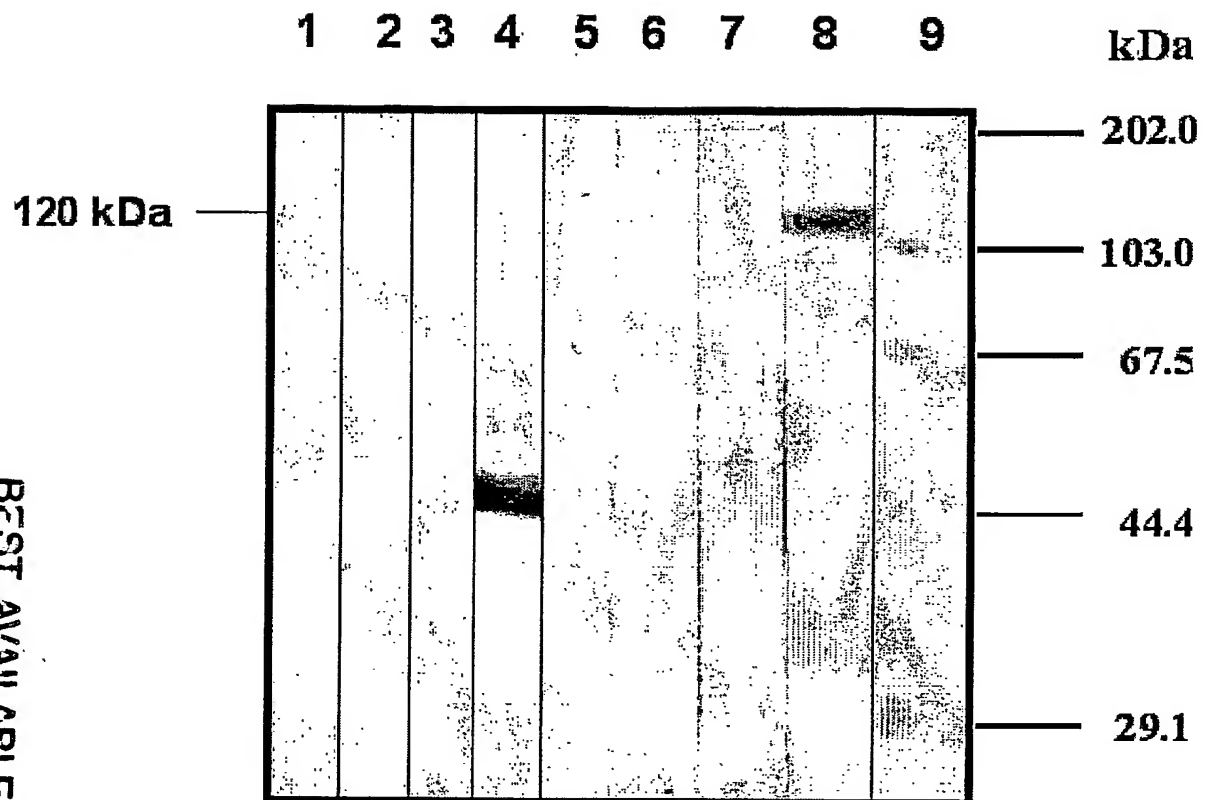
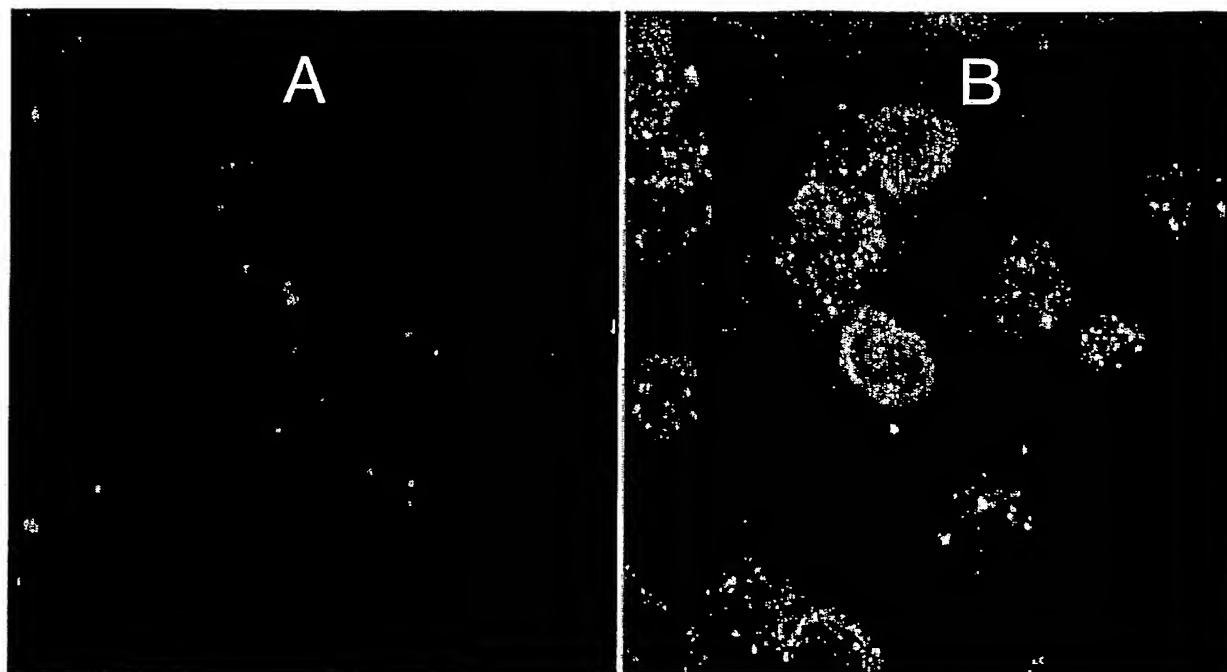


Figura 5



BEST AVAILABLE COPY

Figura 6



BEST AVAILABLE COPY

Figura 7

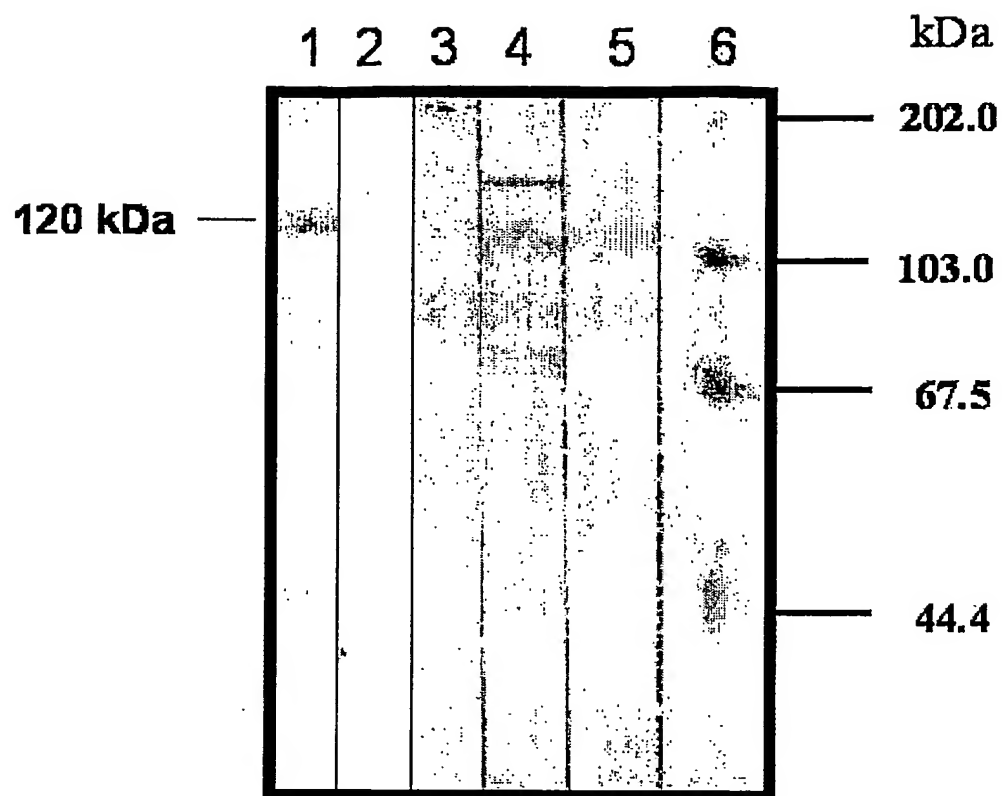


Figura 8

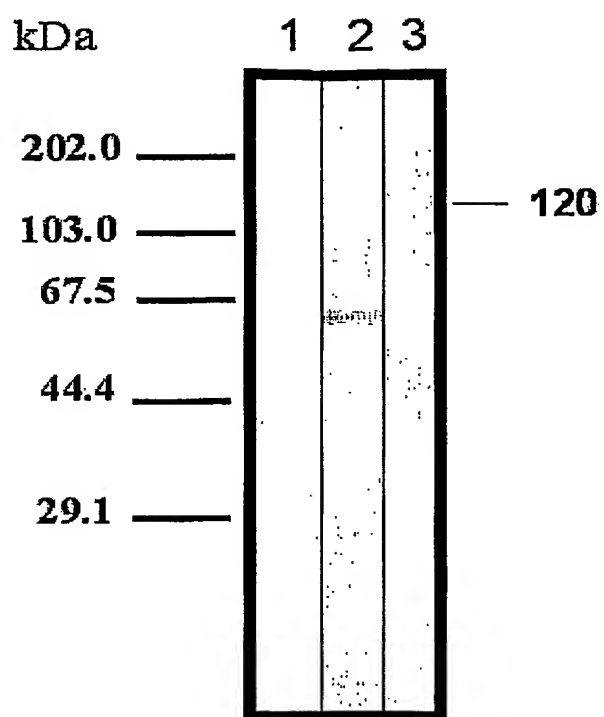


Figura 9

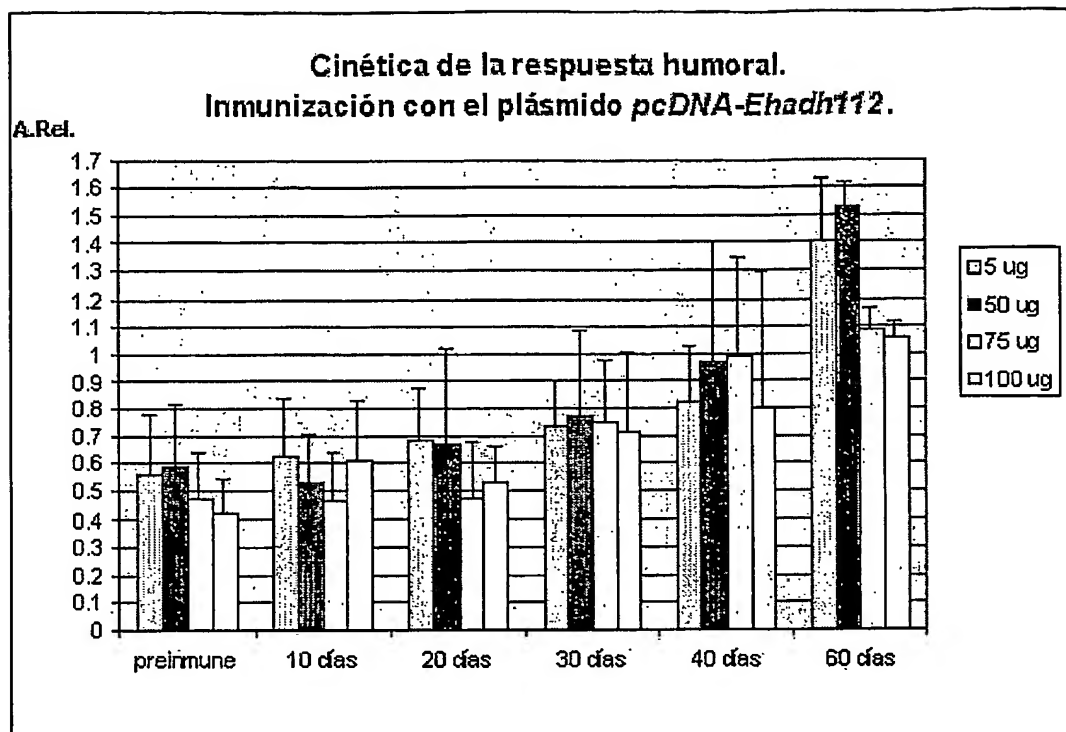


Figura 10

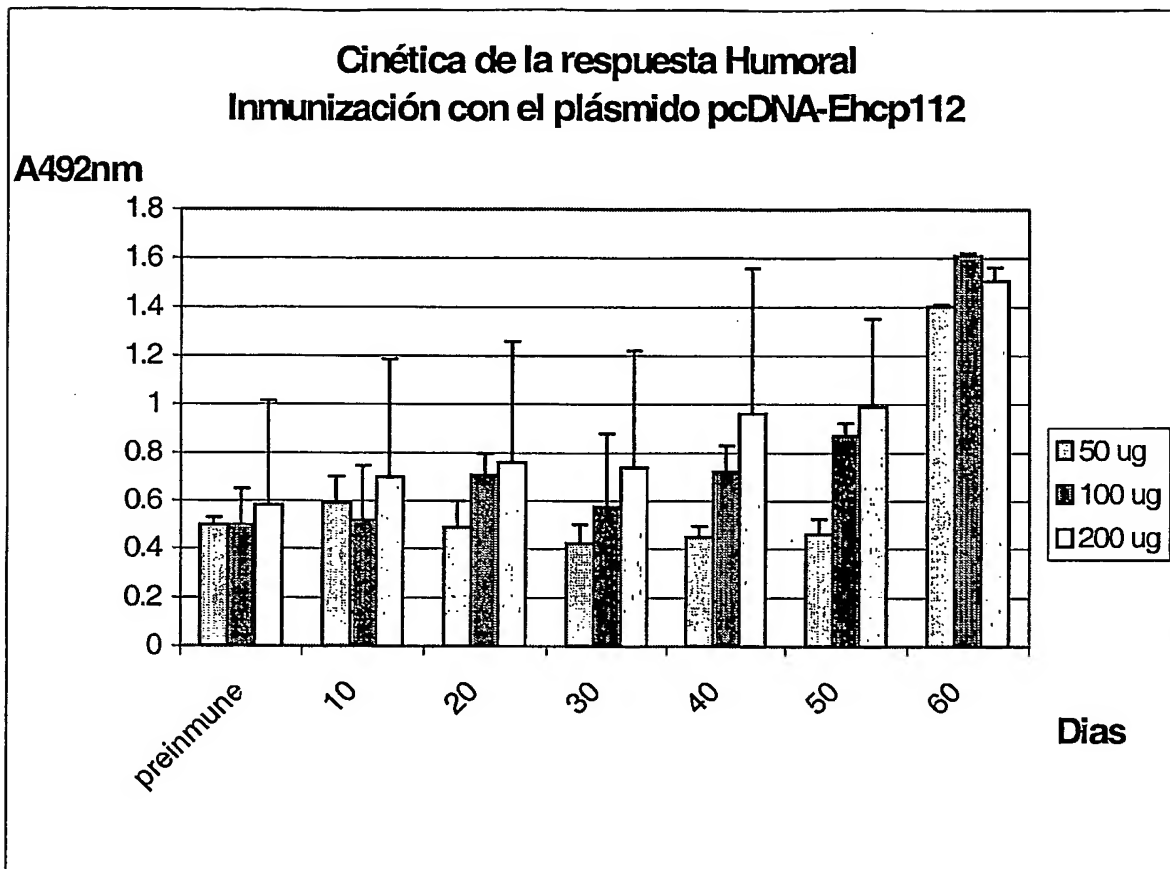
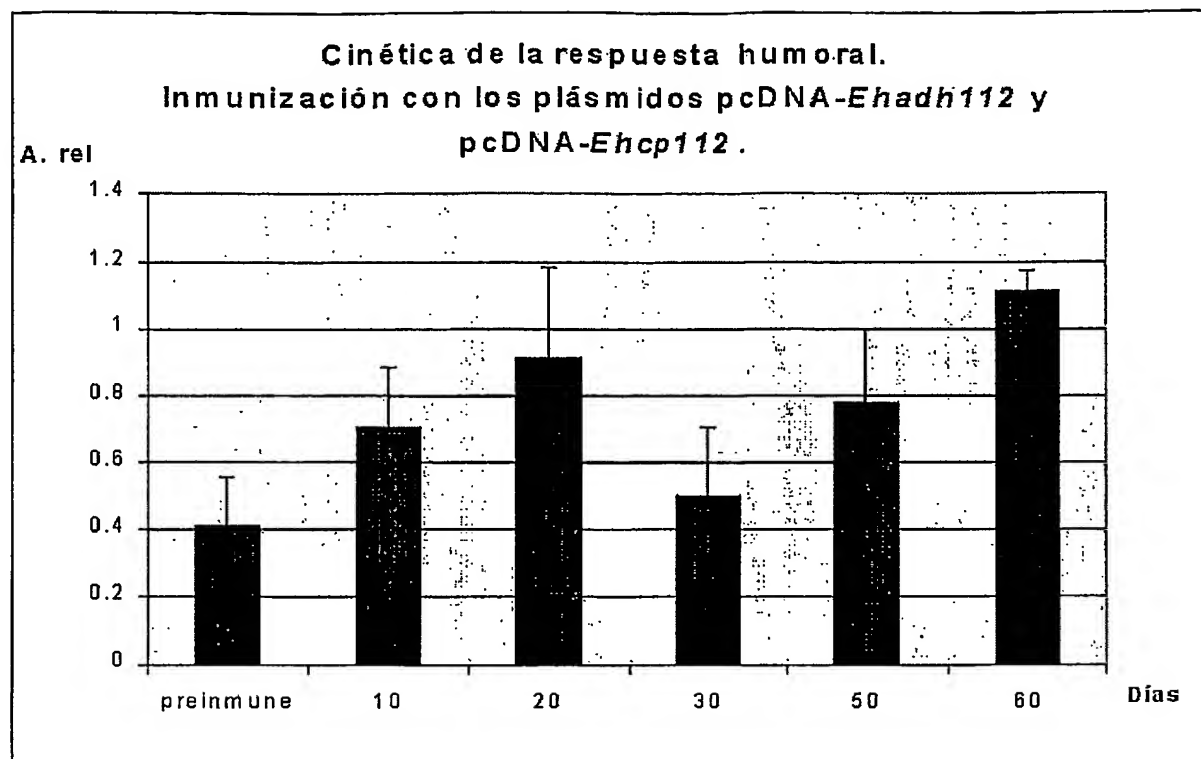


Figura 11



BEST AVAILABLE COPY

Figura 12

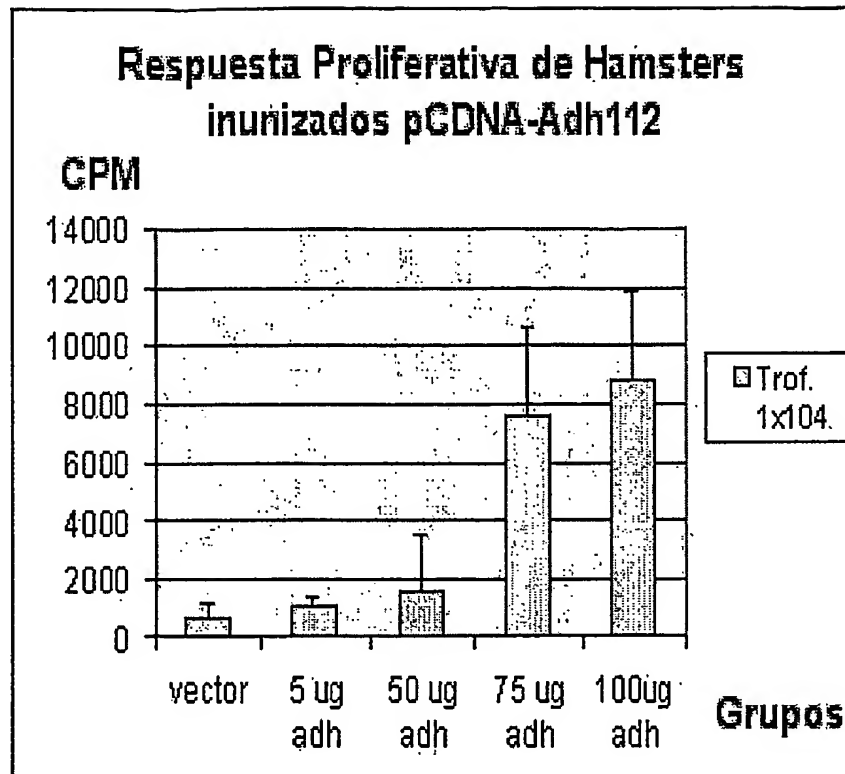


Figura 13

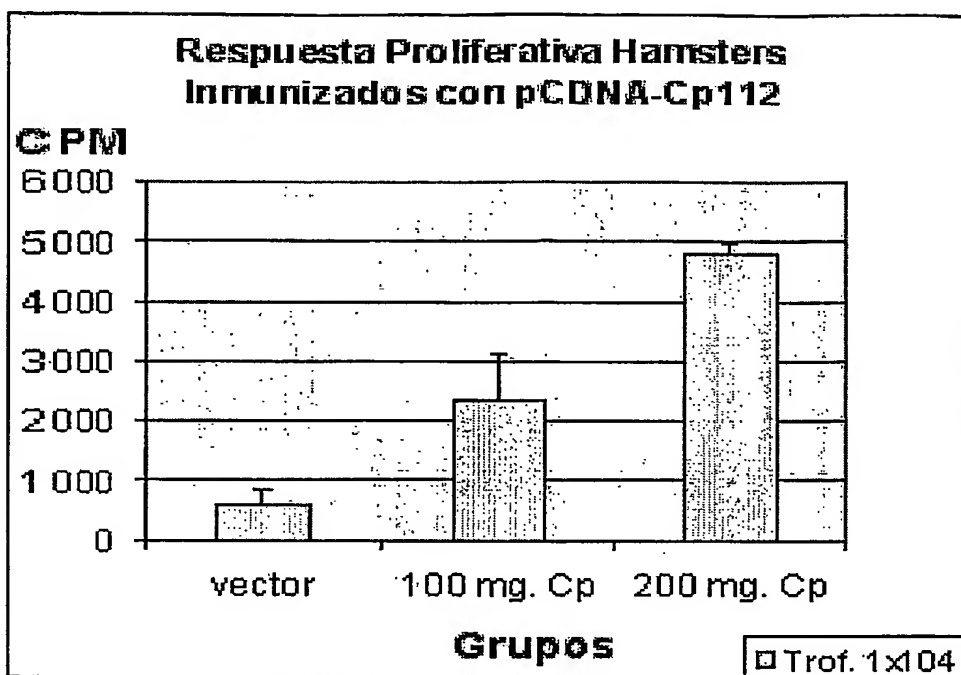


Figura 14

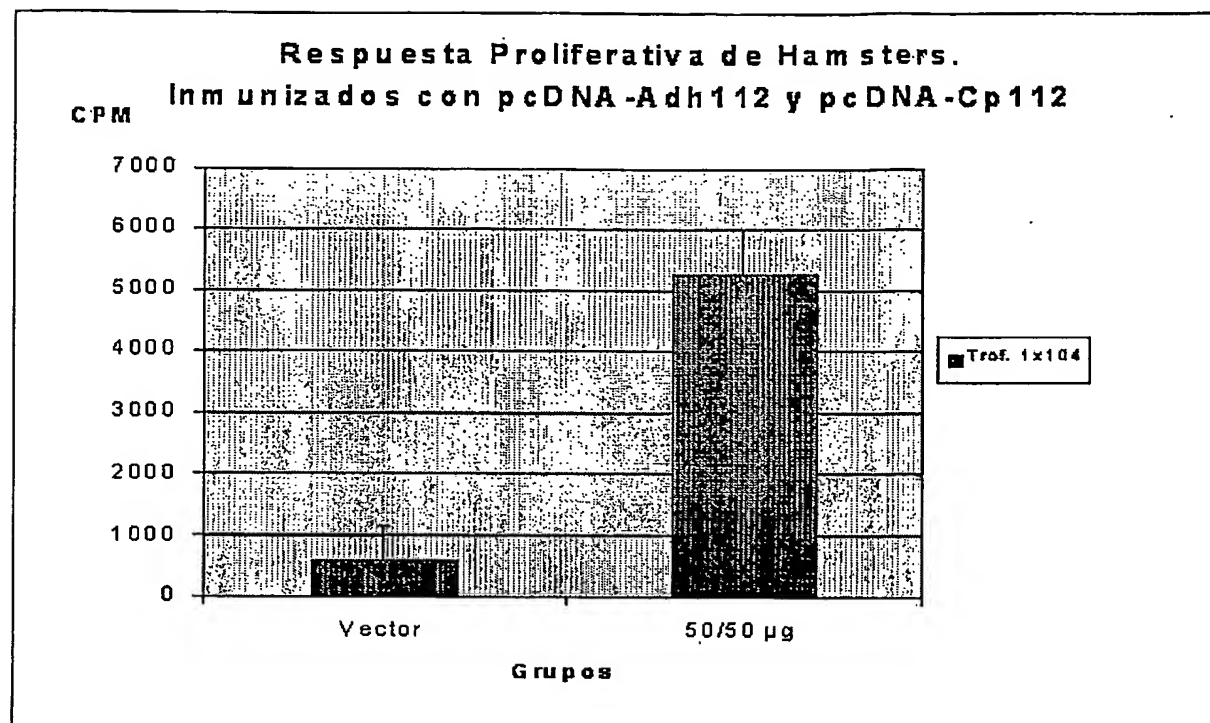


Figura 15

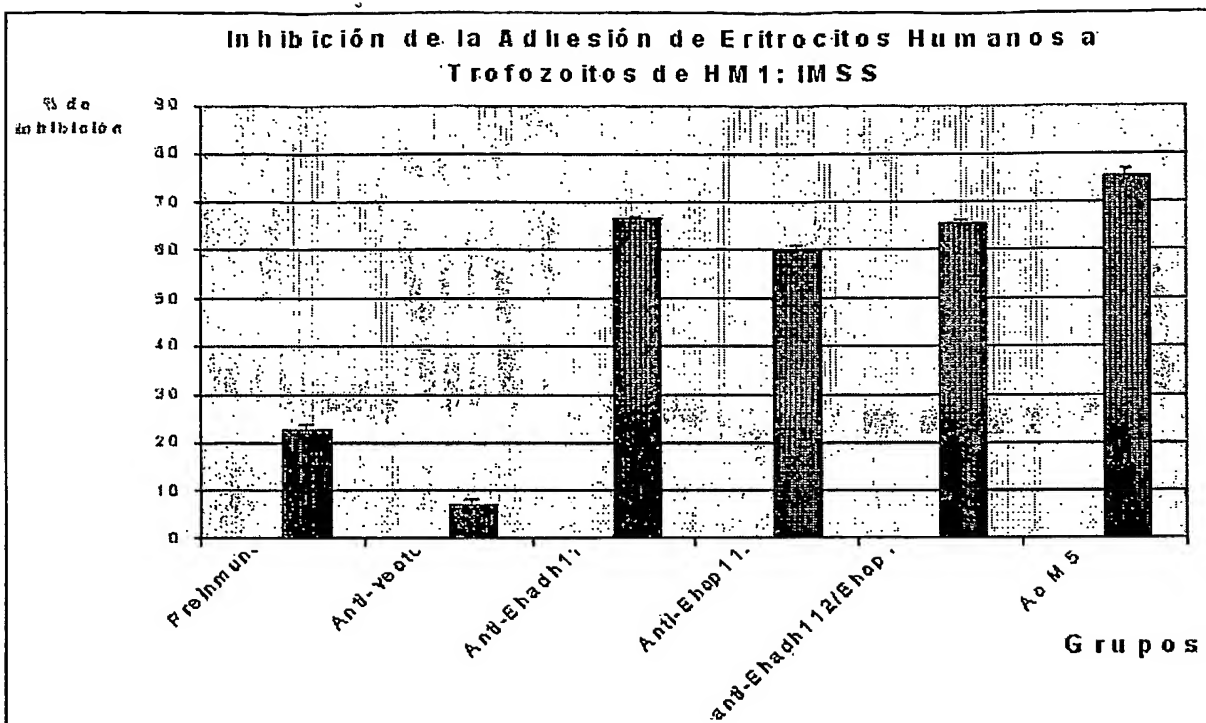


Figura 16

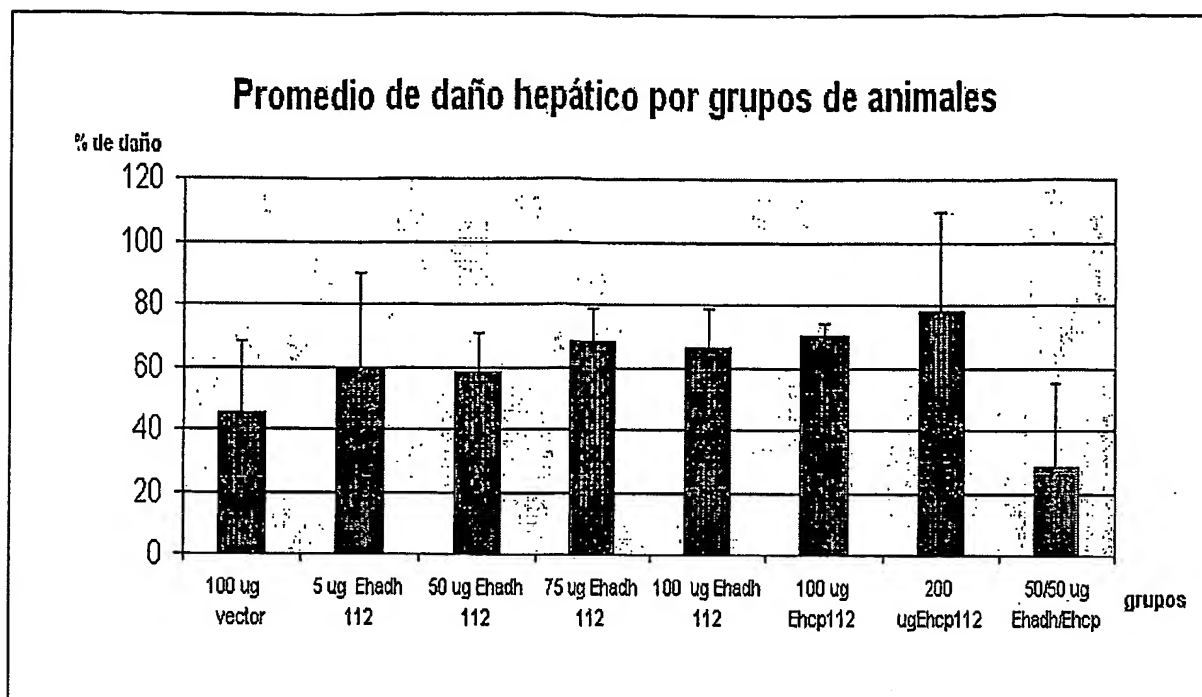


Figura 17

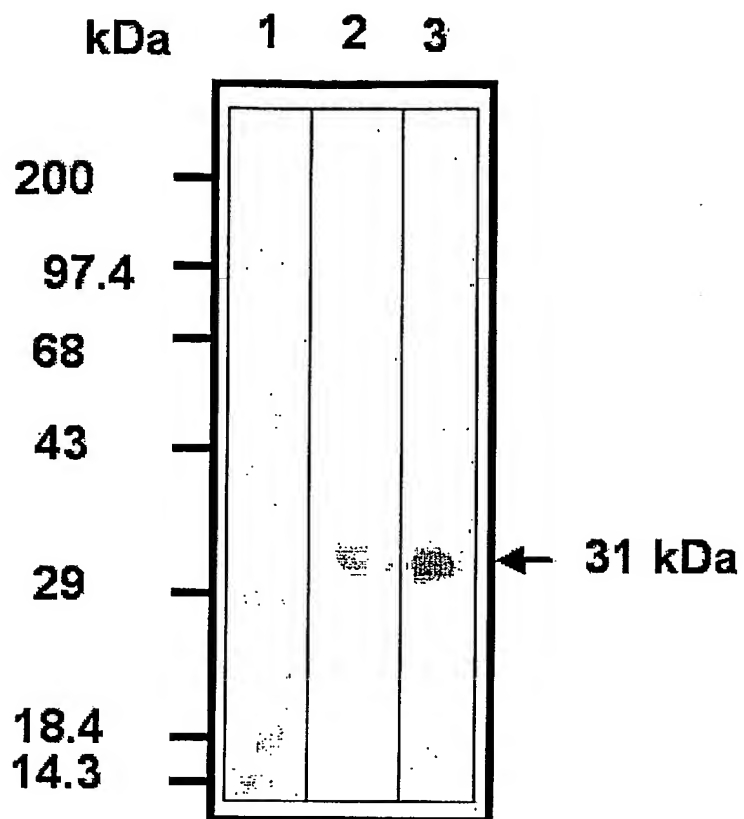
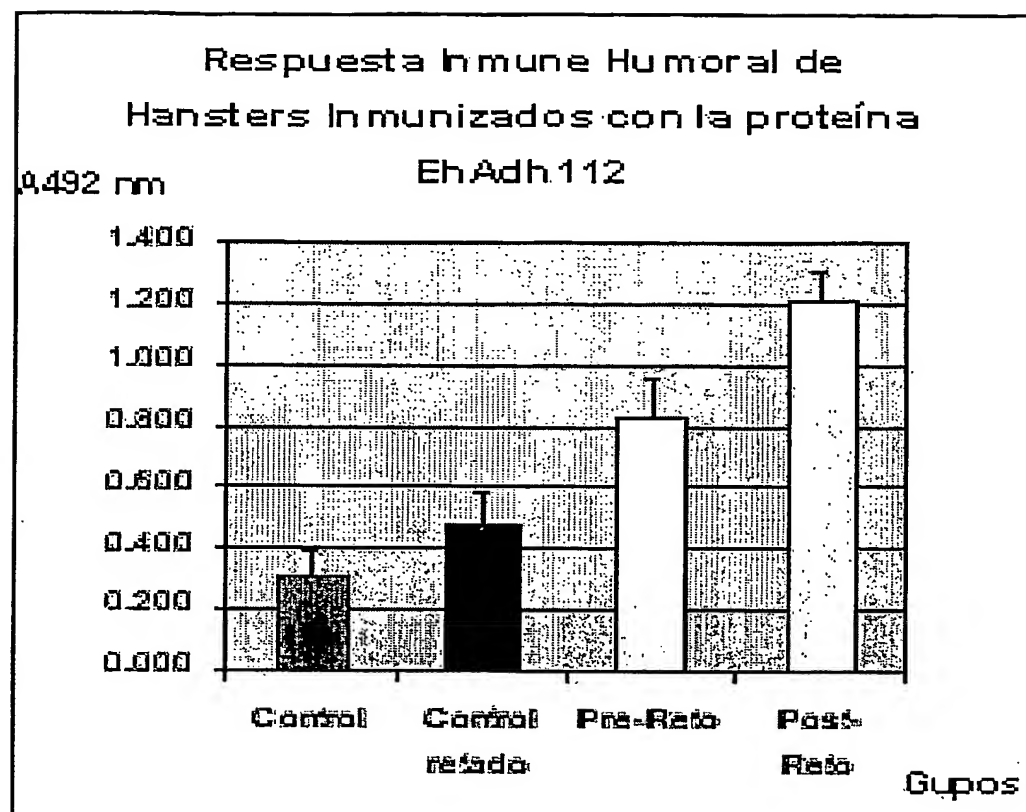


Figura 18



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 2004/000013

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

CIP<sup>7</sup> A61K 39/002, C12N 15/30, C07K 14/44, A61P 33/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

CIP<sup>7</sup> A61K, C12N, C07K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, GenPept, GOOGLE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GARCIA-RIVERA, G. et al. "Entamoeba histolytica: a novel cysteine protease and ahesin form the 112 kDa surface protein". MOLECULAR MICROBIOLOGY. 1999. Vol. 33, n° 3, pages 556-568, the whole document.	1-16
X	GenPept, NCBI, National Institutes of Helth, Bethesda, MD, USA. N° de acceso & Locus AAF04255. 12.06.2000. <b>abstract</b>	1-16
X	GenPept, NCBI, National Institutes of Helth, Bethesda, MD, USA. N° de acceso & Locus AAF04256. 12.06.2000. <b>abstract</b>	1-16
PX	MARTÍNEZ-LÓPEZ, C. et al. "The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by Entamoeba histolytica trophozoites". CELLULAR MICROBIOLOGY. 2004. Vol. 6, n° 4, pages 367-376, the whole document.	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

(21.02.2005)

Date of mailing of the international search report

22.03.2005

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ CU 2004/000013

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 16  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although the claims relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out based on the effects of the composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ CU 2004/000013

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> A61K 39/002, C12N 15/30, C07K 14/44, A61P 33/04

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> A61K, C12N, C07K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, GenPept, GOOGLE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	GARCÍA-RIVERA, G. et al. "Entamoeba histolytica: a novel cysteine protease and ahesin form the 112 kDa surface protein". MOLECULAR MICROBIOLOGY. 1999. Vol. 33, n° 3, páginas 556-568, todo el documento.	1-16
X	GenPept, NCBI, National Institutes of Helth, Bethesda, MD, USA. N° de acceso & Locus AAF04255. 12.06.2000. Resumen.	1-16
X	GenPept, NCBI, National Institutes of Helth, Bethesda, MD, USA. N° de acceso & Locus AAF04256. 12.06.2000. Resumen.	1-16
PX	MARTÍNEZ-LÓPEZ, C. et al. "The EhADH112 recombinant polypeptide inhibits cell destruction and liver abscess formation by Entamoeba histolytica trophozoites". CELLULAR MICROBIOLOGY. 2004. Vol. 6, n° 4, páginas 367-376, todo el documento.	1-16

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

21 Febrero 2005 (21.02.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

22.03.2005

22 MAR 2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

N° de teléfono + 34 91 3495552

**Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)**

De conformidad con el artículo 17(2)(a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: 16  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:  
aunque las reivindicaciones se refieren a un método de tratamiento aplicado directamente al cuerpo humano o animal, la búsqueda se ha realizado en relación a los efectos de la composición.
2. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

**Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)**

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una protesta por parte del solicitante.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.